

OULUN SEUDUN  
AMMATTIKORKEAKOULU



Maija Kärkkäinen

## **AUTOMAATTISEN HOMOSITRULLIINIVASTA-AINEITA MITTAAVAN LABORATORIOMENETELMÄN PYSTYTYS JA VALIDOINTI**

**AUTOMAATTISEN HOMOSITRULLIINIVASTA-AINEITA MITTAAVAN  
LABORATORIOMENETELMÄN PYSTYTYS JA VALIDOINTI**

Maija Kärkkäinen  
Opinnäytetyö  
Kevät 2012  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

## TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikan koulutusohjelma

---

Tekijä: Maija Kärkkäinen

Opinnäytetyön nimi: Automaattisen homositrulliinivasta-aineita mittaavan laboratoriomenetelmän  
pystytys ja validointi

Työn ohjaajat: Marja-Kaisa Koivula, Outi Mäkitalo ja Paula Reponen

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2012

Sivumäärä: 47 + 2 liitettä

---

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli pystyttää ja validoida homositrulliinivasta-aineita mittaava laboratoriomenetelmä IDS-iSYS-immunoanalysaattorille. Työn toimeksiantaja oli Oulun yliopiston Diagnostiikan laitoksen Kliinisen kemian laboratorio. Lähtökohtana työlle olivat jo aikaisemmin tilaajan tutkimusryhmässä kehitetyt sitrulliinivasta-aineita mittaava inhibitio-CLIA (kemiluminesensiin perustuva immunomääritysmenetelmä) sekä homositrulliinivasta-aineita mittaava manuaalinen inhibitio-ELISA (entsyymi-immunologinen menetelmä). Tarkoituksena oli tuottaa tutkimuskäyttöön hyvän toistotarkkuuden, sensitiivisyyden ja spesifisyyden omaava automaattinen laboratoriomenetelmä.

Laboratoriomenetelmän kehittäminen liittyy nivelreumassa esiintyvien kollageeneihin sitoutuvien autovasta-aineiden tutkimiseen. Esimerkiksi sitrullinisoituneet proteiinit voivat aiheuttaa elimistössä autovasta-aineiden muodostumista, ja suurimmalla osalla nivelreumapotilaista esiintyykin sitrulliinivasta-aineita. Homositrulliini ja sitrulliini ovat hyvin samankaltaisia aminohappoja, jotka syntyvät post-translationalisten muokkausten kautta. On todettu, että sitrulliinivasta-aineet ristireagoivat homositrulliinin kanssa. Lisäksi homositrullinisoituneilla proteiineilla voi olla merkitystä sitrulliinivasta-aineiden syntymisessä ja siten nivelreuman etiologiassa.

Aineistona käytettiin nivelreumapotilaiden ja nivelreuman suhteen terveiden kontrollien seeruminäytteitä sekä tunnetun homositrulliinivasta-ainetason omaavia näytteitä eli laatukontrolleja. Menetelmän optimointivaiheessa muokattiin sitrulliinivasta-aineita mittaavaa inhibitio-CLIA-ohjelmaa näytelaimennoksen, sekundaarisen vasta-aineen ja liukoisen inhibiittoripeptidin suhteen. Validointivaiheessa määritettiin potilas- ja kontrolliaineistoista homositrulliinivasta-aineet ja saatuja tuloksia verrattiin manuaalisen inhibitio-ELISA:n antamiin tuloksiin. Potilas- ja kontrolliaineistojen perusteella analysoitiin tilastollisesti menetelmän sensitiivisyys ja spesifisyys. Analyysisarjoissa mukana olleiden laatukontrollinäytteiden perusteella analysoitiin menetelmän toistotarkkuus.

Pystytetty homositrulliinivasta-aineita mittaava inhibitio-CLIA vaikuttaa olevan hyvä työkalu tulevaa tutkimustyötä varten. Sen toistotarkkuus on hyvä ja sensitiivisyys sekä spesifisyys ovat samaa luokkaa referenssimenetelmänä käytetyn inhibitio-ELISA:n kanssa. Opinnäytetyön tavoitteeseen siis päästiin, mutta menetelmää voi tarpeen mukaan kehittää edelleen.

---

Asiasanat: Autovasta-aine, immunoanalysaattori, immunokemiallinen menetelmä, kollageeni, nivelreuma

## ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences  
Degree Programme in Biomedical Laboratory Technology

---

Author: Maija Kärkkäinen

Title of thesis: Automated Detection Method for Antibodies Against Homocitrullinated Proteins:  
Establishment of the Assay and Its Validation

Supervisors: Marja-Kaisa Koivula, Outi Mäkitalo and Paula Reponen

Term and year when the thesis was submitted: Spring 2012

Number of pages: 47 + 2 appendices

---

**BACKGROUND:** There has recently been a lot of interest towards the different autoantibodies related to rheumatoid arthritis (RA). The etiology of this autoimmune disease is not fully understood but it is known that majority of patients with RA have antibodies against citrullinated proteins. Recently it has been discovered that homocitrullinated proteins cross-react with citrulline-binding antibodies and that homocitrullination of proteins could have a role in the etiology of RA. This study was commissioned by the Department of Clinical Chemistry at the Institute of Diagnostics in Oulu University and it was part of a research on RA-related autoantibodies binding to collagens.

**AIM:** The objective of this thesis was to establish and validate an automated detection method for antibodies against homocitrulline containing proteins. The purpose was to develop a laboratory method with good repeatability, sensitivity and specificity for scientific purposes.

**METHODS:** The assay method for detecting antibodies against homocitrullinated peptides was developed by modifying an inhibition chemiluminescence immunoassay for measuring antibodies binding to citrullinated peptides. The assay was optimized for the sample dilution and concentrations of labeled second antibody and inhibitor peptide. Serum samples of patients with RA and healthy controls were used as validation material. The sensitivity and specificity of the assay was evaluated from these results. The results were also compared with results gained from the same material with a reference method, which was a manual inhibition enzyme linked immunoassay. Quality control samples with different levels of antibodies binding to homocitrullinated peptides were analyzed in every series to evaluate the repeatability of the assay.

**RESULTS:** The established detection method for antibodies against homocitrullinated proteins seems to function as expected. Repeatability of the method is good and its sensitivity and specificity are quite similar to the reference method. Therefore it can be used for future research purposes as intended.

---

Keywords: Autoantibody, collagen, immunoanalyzer, immunochemical method, rheumatoid arthritis

# SISÄLLYS

1	JOHDANTO .....	7
2	TEOREETTINEN TAUSTA .....	9
2.1	Sitrulliini- ja homositrulliinivasta-aineiden yhteys nivelreumaan .....	9
2.1.1	Nivelreuma .....	9
2.1.2	Autovasta-aineet sitrullinisoituja ja homositrullinisoituja proteiineja vastaan .....	10
2.1.3	Kollageenit .....	12
2.2	Immunokemialliset menetelmät .....	13
2.2.1	Kemiluminesenssiin perustuva vasta-aineiden määrittäminen .....	14
2.2.2	Entsyymireaktioon perustuva vasta-aineiden määrittäminen .....	17
2.3	Laboratoriomenetelmän validointi .....	17
3	MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	19
3.1	Lähtökohtainen inhibitio-CLIA-ohjelma .....	20
3.2	Käytetyt reagenssit .....	21
3.2.1	Kaupalliset reagenssit ja triggerit .....	21
3.2.2	Syntetiset peptidit ja magneettipartikkelit .....	21
3.2.3	Sekundaarinen vasta-aine .....	23
3.3	Menetelmän pystytys .....	23
3.3.1	Näytelaimennoksen optimointi .....	23
3.3.2	Sekundaarisen vasta-aineen leimauserän ja pipetointitilavuuden optimointi .....	24
3.3.3	Inhibiittoripeptidin konsentraation optimointi .....	25
3.4	Pystytetyn menetelmän validointi .....	25
3.4.1	Potilas- ja kontrolliaineisto .....	25
3.4.2	Laatukontrollit .....	26
3.5	Tilastolliset menetelmät .....	26
4	TULOKSET .....	29
4.1	Homositrulliinivasta-aineita mittaavan inhibitio-CLIA:n pystytys .....	29
4.1.1	Näytelaimennoksen optimoinnin tulokset .....	29
4.1.2	Sekundaarisen vasta-aineen optimoinnin tulokset .....	30
4.1.3	Inhibiittoripeptidin konsentraation optimoinnin tulokset .....	32
4.1.4	Lopullinen inhibitio-CLIA-analyysiohjelma .....	33
4.2	Homositrulliinivasta-aineita mittaavan inhibitio-CLIA:n validoinnin tulokset .....	34

4.2.1	Inhibitio-CLIA:n toistotarkkuus .....	34
4.2.2	Inhibitio-ELISA:n ja inhibitio-CLIA:n välinen korrelaatio .....	36
4.2.3	Inhibitio-CLIA:n sensitiivisyys ja spesifisyys sekä vertailu inhibitio-ELISA:an .....	37
4.2.4	Inhibitio-ELISA:n ja inhibitio-CLIA:n välinen ristiintaulukointi .....	39
5	POHDINTA .....	41
	LÄHTEET .....	44
	LIITTEET .....	48

# 1 JOHDANTO

Tämän opinnäytetyön toimeksiantaja on Oulun yliopiston Diagnostiikan laitoksen Kliinisen kemian laboratorio, jossa on tehty paljon tutkimusta nivelreumassa esiintyviin kollageeneihin sitoutuviin autovasta-aineisiin liittyen. Kyseisessä laboratoriossa on käytössä automaattinen IDS-iSYS-analysaattori, jolla voidaan tehdä muun muassa kemiluminesenssiin perustuvia immunologisia määrittäyksiä. Koivula (2006) on kehittänyt analysaattorille epäsuoran kemiluminesenssiin perustuvan immunologisen menetelmän (CLIA) sitrulliini-autovasta-aineiden mittaamiseen ja myöhemmin menetelmästä on muokattu myös inhibitio-CLIA (Koivula, Häyrynen & Risteli, julkaisematon käsikirjoitus). Kehitetyt menetelmät mittaavat sellaisia autovasta-aineita, jotka sitoutuvat sitrullinisoituneisiin tyypin I ja II kollageenien telopeptideihin. Edellä mainittuja vasta-aineita tiedetään löytyvän suurelta osalta nivelreumapotilaita. Nivelreuman diagnostiikassa olisi tarvetta entistä paremmille merkkiaineille, koska kaikilta nivelreumapotilailta ei havaita kohonneita pitoisuuksia nykyisin kliinisesti käytössä olevien merkkiaineiden, kuten reumafaktorin, suhteen. (Risteli, Koivula & Risteli 2007, 190.)

Sitrulliini on aminohappo, jota ei liitetä peptidiketjuun proteiinin synteesivaiheessa, vaan se muodostetaan entsyymaattisesti arginiinista. Sitrullinisoituneet proteiinit voivat aiheuttaa elimistössä autovasta-aineiden muodostumista. (Koivula 2006, 28.) Vastikään on havaittu, että sitrulliinivasta-aineet ristireagoivat rakenteeltaan hyvin samankaltaisen aminohapon, homositrulliinin kanssa. Näiden havaintojen perusteella on mahdollista, että homositrullinisoituneilla proteiineilla on merkitystä sitrulliinivasta-aineiden syntymisessä ja siten nivelreuman etiologiassa (Turunen, Koivula, Risteli & Risteli 2010, 3345, 3350). Opinnäytetyön toimeksiantajan tutkimusryhmä on ryhtynyt selvittämään asiaa syvemmin ja tätä tarkoitusta varten he tarvitsevat IDS-iSYS-analysaattorille homositrulliinivasta-aineita mittaavan automaattisen menetelmän.

Tämän opinnäytetyön tavoitteina on pystyttää ja validoida homositrulliinivasta-aineita mittaava inhibitio-CLIA automaattiselle IDS-iSYS-immunoanalysaattorille, jotta sitä voidaan hyödyntää tulevassa tutkimustyössä. Opinnäytetyön toimeksiantajalla on jo käytössään manuaalinen homositrulliinivasta-aineita mittaava inhibitio-ELISA (entsyymi-immunomenetelmä), mutta automaattisen inhibitio-CLIA:n pystyttämiseksi on monta perustetta. Automaattisella analysaattorilla työskennellessä määrittäisiin vaadittava työmäärä on manuaaliseen menetelmään verrattuna paljon pienempi. Myös esimerkiksi pipetointitarkkuus on automatisoidussa menetelmässä parempi. Lisäksi

CLIA voi olla ELISA:a huomattavasti sensitiivisempi, sillä sitrulliinivasta-aineiden määrittämisessä on menetelmien välillä havaittu kyseinen ero (Koivula 2006, 67).

Opinnäytetyön aineistona käytetään nivelreumapotilaiden ja terveiden kontrollien seeruminäytteitä, jotka saadaan toimeksiantajalta. Analyysisarjoissa mukana olevien laatukontrollien eli tunnetun homositrulliinivasta-ainetaso omaavien näytteiden (nollanäyte, matala, keskitaso ja korkea) perusteella analysoidaan menetelmän toistotarkkuus. Menetelmän sensitiivisyys ja spesifisyys analysoidaan potilas- ja kontrolliaineistojen perusteella. Lisäksi tuloksia vertaillaan manuaalisella inhibitiio-ELISA:lla saatuihin tuloksiin samoista potilas- ja kontrolliaineistoista. Tulosten tilastollisessa analysoinnissa käytetään SPSS- ja Analyse-it-ohjelmia. Työn tarkoituksena on tuottaa tutkimuskäyttöön hyvän toistotarkkuuden, sensitiivisyyden ja spesifisyyden omaava työkalu homositrulliinivasta-aineiden määrittämistä varten.



## 2 TEOREETTINEN TAUSTA

### 2.1 Sitrulliini- ja homositrulliinivasta-aineiden yhteys nivelreumaan

Autoimmuunisairauksissa syntyy vasta-aineita elimistön omia rakenteita kohtaan. Nivelreuma on systeeminen autoimmuunisairaus, jonka diagnostiikassa voidaan käyttää apuna autovasta-aineiden määrittämistä. (Haapala 2010, 161–163.) Monet nivelreumapotilaiden seerumista löydettyt vasta-aineet sitoutuvat sitrullinisoituihin peptideihin. Nivelten rakenteissa sijaitsevien kollageenien sitrullinisoitumisen on arveltu liittyvän nivelreuman syntyyn autovasta-aineiden muodostumisen kautta (Koivula, Åman, Karjalainen, Hakala & Risteli 2005, 1443). Homositrulliinin on huomattu ristireagoivan sitrulliinin kanssa, koska ne ovat rakenteeltaan hyvin samanlaisia aminohappoja (Turunen ym. 2010, 3345).

#### 2.1.1 Nivelreuma

Nivelreuma (rheumatoid arthritis, RA) on krooninen autoimmuunisairaus, jota tavataan Suomessa noin yhdellä prosentilla väestöstä. Se on tulehduksellinen nivelsairaus, joka ilmenee yleensä ikääntyneillä ihmisillä tavallisimman puhkeamisiän ollessa 60 vuotta. Sairaus voi kuitenkin alkaa missä iässä tahansa. (Mustajoki 2010, hakupäivä 6.6.2011.) Sairastuneisiin niveliin kulkeutuneet aktivoituneet valkosolut aiheuttavat nivelkalvolla hyperplasiaa ja tulehdusta, mikä johtaa ruston ja luun etenevään vaurioitumiseen (Boekel, Vossenaar, Hoogen & Venrooij 2002, 87). Oireilu alkaa usein pienistä ja keskisuurista nivelistä, esimerkiksi sorminivelten särkynä ja turvotuksena tai päkiöiden kävelyarkuutena. Alkuvaiheessa esiintyy yleensä lievää nivelkipua ja vähintään tunnin kestävää aamujäykkyyttä. Myöhemmin nivelet turpoavat ja niiden liikuttaminen on kivuliasta. Symmetrisyys on nivelreumalle tyypillistä, sillä yleensä molempien käsien tai jalkojen nivelet sairastuvat yhtä aikaa. Naisilla nivelreuma on 2–3 kertaa yleisempi kuin miehillä, mutta miehillä tupakoinnin on havaittu kasvattavan sairastumisriskin lähes nelinkertaiseksi tupakoimattomiin henkilöihin verrattuna. Nivelreuman perimmäistä syytä ei ole saatu selvitettyä, mutta perinnöllisen alttiuden tiedetään lisäävän sairastumisriskiä. Myös tiettyjen virusten tai bakteerien on arveltu liittyvän nivelreumalle tyypillisen tulehdusreaktion syntyyn. (Mustajoki 2010, hakupäivä 6.6.2011.)

Nivelreuman diagnoosi perustuu käytännössä potilaan kuvaamiin oireisiin ja kliiniseen tutkimukseen. Lisäksi voidaan käyttää apuna laboratoriotutkimuksia, kuten veren laskoa, joka voi olla ko-

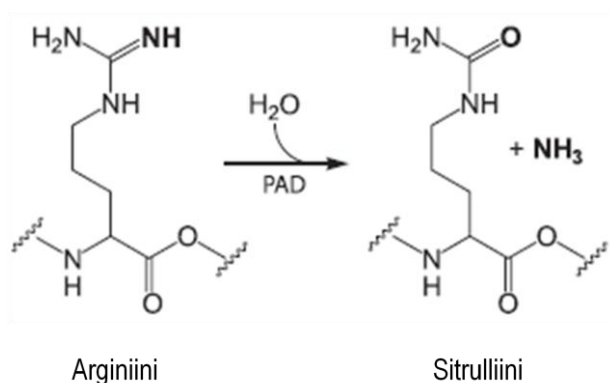
honnut. Niin sanottuja reumakokeita ovat reumatekijän ja sitrulliinivasta-aineiden määrittäminen potilaan verestä. Myös nivelnesteen tutkiminen voi auttaa taudin toteamisessa. (Mustajoki 2010, hakupäivä 6.6.2011.) Reumatekijä on koholla noin kahdella kolmasosalla tuoretta nivelreumaa sairastavista potilaista. Toisaalta positiivisia reumatekijälöydöksiä voi olla muissakin tiloissa, joten kyseinen tutkimus antaa viitteitä nivelreumasta, mutta ei ole diagnoosin edellytys. 40–60 prosenttia tuoretta nivelreumaa sairastavista potilaista on sitrulliinivasta-ainepositiivisia. Näitä vasta-aineita löydetään vain harvoin muissa tiloissa kuin nivelreumassa ja niiden esiintyminen potilaalla liittyy vaikeampaan taudinkulkuun. (Käypä hoito -suositus 2009, 4.) Tupakoinnin on todettu lisäävän nivelreumaan sairastumisen riskiä etenkin niillä potilailla, joilta löytyy sitrulliinivasta-aineita. Ilmeisesti pitkäaikainen altistuminen tupakansavulle voi lisätä proteiinien sitrullinisaatiota keuhkoissa. (Klareskog, Padyukov & Alfredsson 2007, 50–51.) Autovasta-aineiden muodostumisen voi mahdollisesti aiheuttaa myös tupakoinnin seurauksena tapahtuva proteiinien homositrullinisoituminen (Wang, Nicholls, Rodriguez, Kummu, Hörkkö, Barnard, Reynolds, Topol, DiDonato & Hazen 2007, 1177).

## **2.1.2 Autovasta-aineet sitrullinisoituja ja homositrullinisoituja proteiineja vastaan**

Autoimmuunisairauksissa jokin elimistön oma rakenne, esimerkiksi proteiini, toimii antigeenina ja saa aikaan immuunivasteen. Sen seurauksena syntyviä vasta-aineita kutsutaan autovasta-aineiksi ja ne voivat olla immunoglobuliini G (IgG), immunoglobuliini M tai immunoglobuliini A -luokkaa. Autoimmuunitauti voi olla elinspesifinen, jolloin immunologinen reaktio kohdistuu tietystä elimestä löytyvää antigeeniä kohtaan. Nivelreuma taas kuuluu niin sanottuihin systeemisiin autoimmuunitauteihin, joissa varsinaista kohde-elintä ei ole. Autoimmuunisairauksissa oireet ovat yleensä moninaisia, joten niiden diagnostiikka on haastavaa. Diagnostiikassa sekä taudin seurannassa ja sen kulun ennustamisessa käytetään apuna autovasta-ainemäärityksiä. Yleisesti määrityksissä käytetään erilaisia entsyymi-immunologisia menetelmiä (EIA) ja mitattavat autovasta-aineet ovat luokkaa IgG. Koska autovasta-aineita voi löytyä myös terveiltä henkilöiltä ja muissa tiloissa kuin autoimmuunisairauksissa, laboratoriotuloksia on tulkittava kliinisen taudinkuvan mukaan. (Haapala 2010, 161–163.)

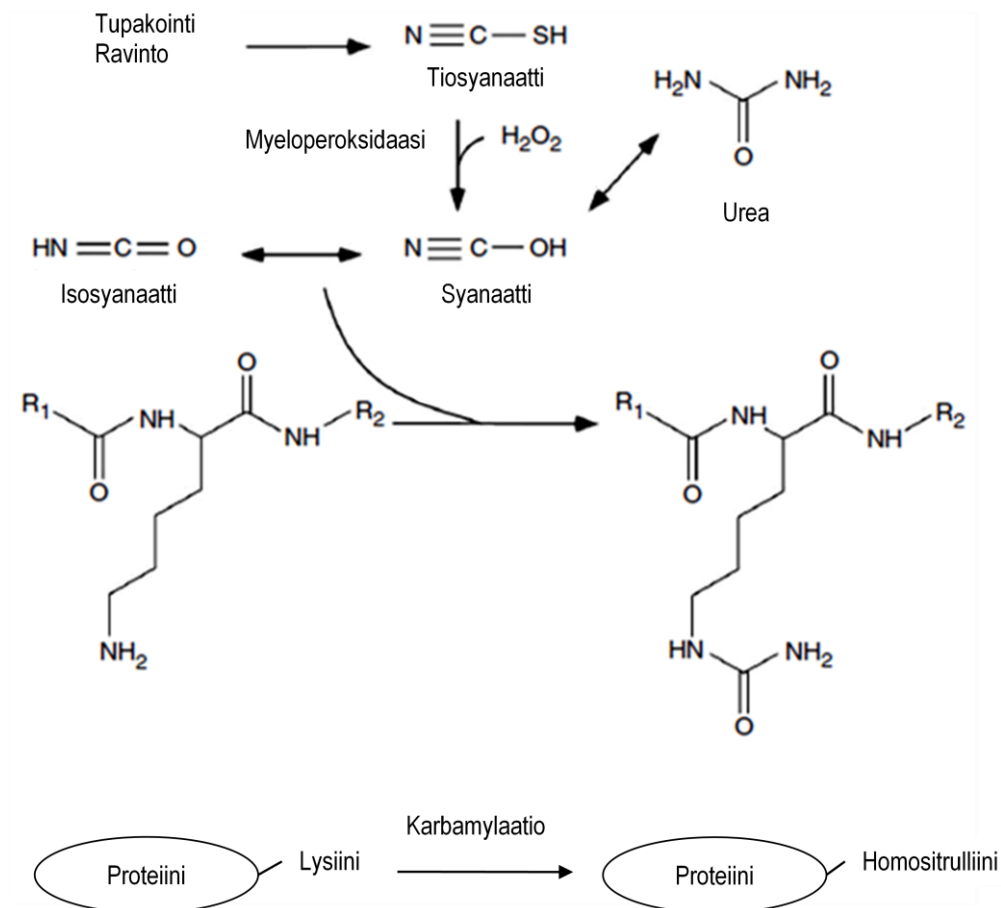
Nivelreumapotilaiden seerumista on tunnistettu useita erilaisia autovasta-aineita ja monet niistä kohdistuvat sitrullinisoituja proteiineja kohtaan. (Koivula ym. 2005, 1443.) Sitrulliini on proteiineissa esiintyvä aminohappo, joka muodostuu arginiinista post-translationalaisesti eli sitä ei liitetä peptidiketjuun proteiinisynteesissä. Peptidyylarginiini-deiminaasi-entsyymit (PAD) katalysoivat ar-

giniinin muuttumisen sitrulliiniksi (kuvio 1). Reaktiossa arginiinin sivuketjun viimeiseen hiileen kaksoissidoksella liittynyt typpi korvautuu hapella. (Risteli, Koivula & Risteli 2007, 188.) Minkä vain proteiinin arginiinitähde voi periaatteessa sitrullinisoitua ja toimia viereisten aminohappojen kanssa antigeenisena epitooppina, johon vasta-aine voi sitoutua (Koivula 2006, 28). Proteiinien sitrullinisaatio ei väistämättä aiheuta sitrulliinivasta-aineiden muodostumista, vaan niiden syntyminen edellyttää nivelreuman geneettisten riskitekijöiden läsnäoloa (van Venrooij, van Beers & Pruijn 2011, 391).



KUVIO 1. Arginiinin post-translationalinen muokkaus sitrulliiniksi PAD-entsyymin avulla (muokattu: Mydel, Wang, Brisslert, Hellvard, Dahlberg, Hazen & Bokarewa 2010, 6884).

Homositrulliini on sitrulliinin kanssa miltei homologinen molekyyli. Se voi syntyä lysiinistä non-entsymaattisesti karbamylation kautta ja eroaa sitrulliinista vain siten, että sen sivuketju on yhden hiilen pidempi. (Turunen ym. 2010, 3345.) Kuviossa 2 on esitetty karbamyliatioreaktio, jossa proteiinin lysiini-aminohappotähde muuttuu homositrulliiniksi. Proteiinien homositrullinisoitumisessa tärkeä lähtöaine on isosyanaatti, jota voi muodostua kudoksissa esimerkiksi seerumin korkean ureapitoisuuden eli uremian takia. Isosyanaattia voi mahdollisesti syntyä myös myeloperoksidaasi-entsyymin katalysoimassa reaktiossa, jossa lähtöaineina ovat tiosyanaatti ja vetyperoksidi (kuvio 2). Tiosyanaattia saadaan ravinnosta, mutta tupakoitsijoilla sen pitoisuus plasmassa on huomattavasti korkeampi kuin muilla. Myeloperoksidaasia on runsaasti neutrofiileissä, monosyyteissä ja tiettyjen kudosten makrofageissa, joten tulehdusreaktio voi lisätä proteiinien karbamyliatiota. (Wang ym. 2007, 1176–1177.)



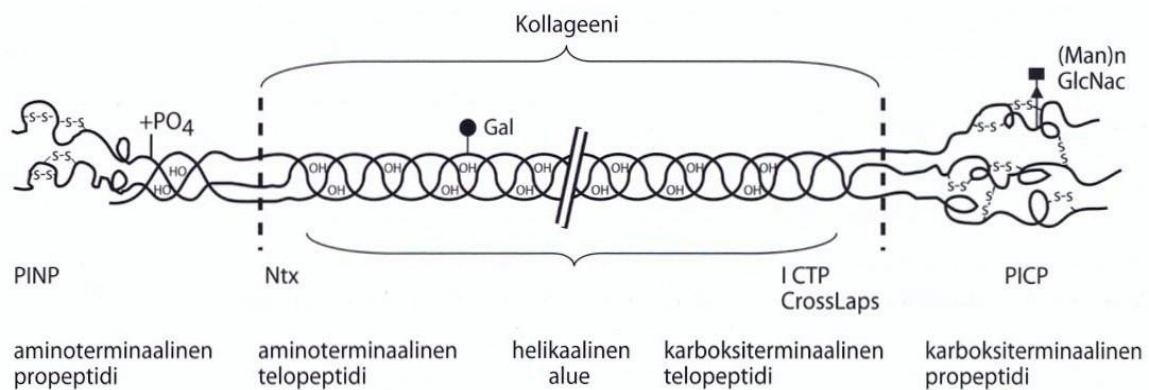
KUVIO 2. Proteiinin homositrullinisoituminen karbamylaatioreaktiossa (muokattu: Wang ym. 2007, 1177)

Vastikään on havaittu, että homositrulliini ristireagoi sitrullinisoituneiden proteiinien määrittämisessä käytetyn vasta-aineen kanssa. Näin ollen kyseinen vasta-aine ei olekaan spesifinen sitrulliinille, vaan ureidoryhmälle ( $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ). Analyysimenetelmän epäspesifisyyden lisäksi on huomioitava, että homositrulliini on mahdollisesti osallisena elimistössä tapahtuvassa sitrulliinivasta-aineiden muodostuksessa. (Turunen ym. 2010, 3350.)

### 2.1.3 Kollageenit

Kollageenit ovat sidekudoksen runsain rakenneosia ja niitä on lähes kolmekymmentä erilaista tyyppiä. Ne ovat soluväliaineen proteiineja, jotka osaltaan mahdollistavat eri sidekudosten toiminnallisen erikoistumisen. Kollageenimolekyylit rakentuu kolmesta toistensa ympärille kiertyneestä polypeptidiketjusta ( $\alpha$ -ketjut), jotka ovat kollageenityypistä riippuen joko identtisiä tai toisistaan eroavia. (Koivula 2006, 31; Risteli & Risteli 2010, 181.)

Tyypin I kollageeni on ihmiselimestön yleisin proteiini, josta suurin osa esiintyy luissa. Myös pehmytkudoksissa on tyypin I kollageenia, esimerkiksi jänteissä se on ainoa kollageenityyppi. Tyypin II kollageenia puolestaan esiintyy erityisesti rustokudoksessa. Tyypin I ja II kollageenit ovat säikeitä muodostavia proteiineja. Ne syntyvät niin sanottuina prokollageeneina (kuvio 3), joista poistetaan entsymaattisesti suuri propeptidiosa sekä amino- että karboksiterminaalista päästä, minkä jälkeen kollageenimolekyylit kiinnittyvät toisiinsa kovalentein sidoksien muodostaen kestävän säierakenteen. (Risteli & Risteli 2010, 181.) Varsinaiseen kollageenimolekyylin jää kierteisen eli helikaalisen alueen lisäksi amino- ja karboksiterminaaliset telopeptidit. Koivula (2006) on tutkinut väitöskirjassaan tyypin I ja II kollageenien karboksiterminaalisia- eli C-telopeptidejä ja niiden sitrullinisoituneihin muotoihin sitoutuvia autovasta-aineita.



KUVIO 3. Tyypin I prokollageenin rakenne (Risteli & Risteli 2010, 181). Kuvion alapuolella olevat lyhenteet on selitetty niiden alla ja rakenteeseen liittyvät hiilihydraattiketjut ovat: Gal = galaktoosi, GlcNac = N-asetyyglukosamiini, (Man)n = n lukumäärä mannoosi-tähteitä.

Jo kauan on arveltu, että kollageeneihin kohdistuva autoimmuunireaktio voisi olla yhteydessä nivelreuman syntyyn ja kehittymiseen (Koivula ym. 2005, 1443). On todettu, että sitrullinisoituneisiin kollageeneihin sitoutuvat vasta-aineet voivat ennustaa seroposiitivista nivelreumaa (Koivula 2006, 72). Kyseisiä vasta-aineita voi esiintyä henkilön veressä jo vuosia ennen nivelreuman oireiden puhkeamista (Koivula, Heliövaara, Ramberg, Knekt, Rissanen, Palosuo, & Risteli 2007, 1450).

## 2.2 Immunokemialliset menetelmät

Immunologisen reaktion seurauksena tuotetut vasta-aineet sitoutuvat spesifisesti tiettyyn anti-geeniin ei-kovalenttisin sidoksien. Muodostunut kompleksi on suhteellisen pysyvä, joten sitä voidaan hyödyntää immunokemiallisissa menetelmissä. Vasta-aineiden ainutlaatuisia ominaisuuksia

hyödyntävillä immunokemiallisilla menetelmillä voidaan mitata hyvin pieniä määriä tiettyä analyytistä muun näytemateriaalin joukosta eli ne ovat sekä sensitiivisiä että spesifisiä analyysimenetelmiä. (Davies 2005, 3.) Niitä käytetään esimerkiksi lääkeaine-, hormoni- ja vastaainemäärytyksissä. Menetelmissä joko antigeeni tai vasta-aine on leimattu merkkiaineella, jonka pitoisuus voidaan mitata, ja saadaan tietää analyytin määrä näytteessä. Merkkiaine voi olla esimerkiksi radioaktiivinen aine, mutta yleensä automatisoiduissa menetelmissä käytetään muun muassa fluoresenssiin, kemiluminesenssiin tai entsyymireaktioon perustuvia leimoja. (Savolainen & Parviainen 2010, 65.)

Automaattisella IDS-iSYS-immunoanalysaattorilla voidaan tehdä immunologisia, biokemiallisia ja hyytymismääryksiä. Analysaattori toimii random access -periaatteella, eli sillä voidaan tehdä samanaikaisesti erilaisia määryksiä useista näytteistä. Immunologisissa määryksissä laite hyödyntää magneettisia mikropartikkeleita ja kemiluminesenssiin perustuvaa menetelmää. (Immuno-diagnostic Systems 2010, 3.) Seuraavissa luvuissa kerrotaan tarkemmin tässä opinnäytetyössä käytetystä kemiluminesenssiin perustuvasta määryksestä sekä vertailumenetelmänä toimivasta entsyymi-immunomenetelmästä.

### **2.2.1 Kemiluminesenssiin perustuva vasta-aineiden määrittäminen**

Kemiluminesenssiin perustuva immunologinen menetelmä (chemiluminescence immunoassay, CLIA) pohjautuu merkkiaineisiin, jotka kemiallisen reaktion seurauksena emittoivat eli lähettävät valoa. Se on huomattavasti sensitiivisempi menetelmä kuin radioisotooppeihin tai fluoresoiviin leimoihin pohjautuvat menetelmät. Yleensä kemiluminesenssi tapahtuu lähes välittömästi reaktion aloittavan reagenssin lisäyksen jälkeen. Valon intensiteetti ja reaktioajankohta riippuvat käytettävästä leimasta. Reaktionopeuksista johtuen määrittämisessä on käytettävä automatisoitua analyysaattoria, joka sekä lisää reagenssin että mittaa emittoituneen valon määrän. (Kricka & Wild 2010, 197, 203.) Tässä opinnäytetyössä analyysieihin käytetään IDS-iSYS-immunoanalysaattoria.

CLIA:ssa käytetään streptavidiinilla päällystettyjä magneettipartikkeleita, joiden pinnalle anti-geeninä toimiva molekyyli sidotaan. Nimestään huolimatta nämä partikkelit eivät ole varsinaisesti magneettisia, vaan paramagneettisia. Paramagneettinen aine liikkuu magneetikentässä kentän voimakkainta osaa kohti, mutta kun magneetti poistetaan sen läheisyydestä, se käyttäytyy kuin mikä tahansa aine. Paramagneettisen luonteen saavuttamiseksi selluloosa- tai lateksipartikkelit päällystetään rautaoksidilla. Rautaoksidikerros ei kuitenkaan pääse kosketuksiin reaktioliuoksen

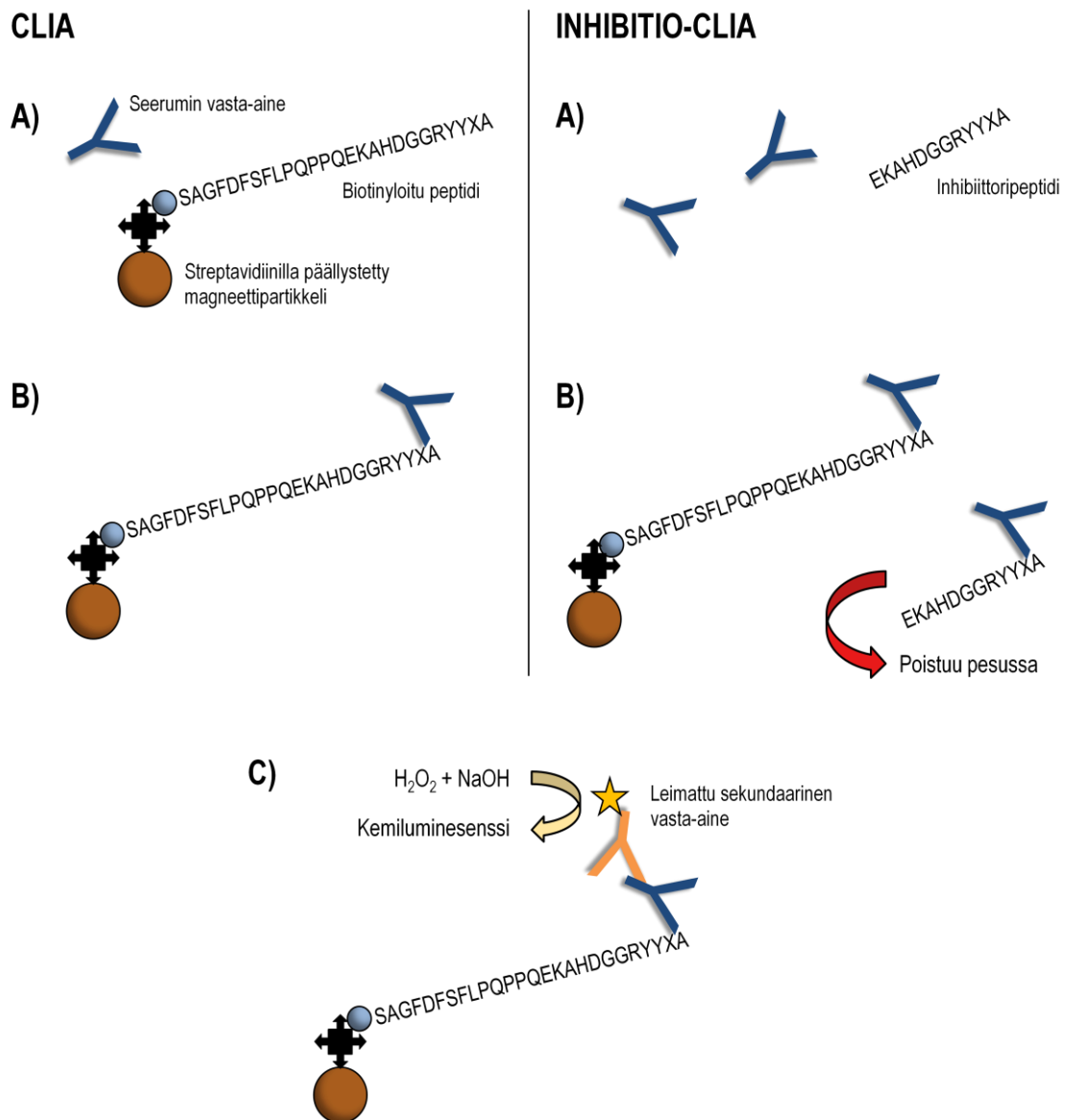
kanssa, koska se peitetään vielä pintakerroksella. Magneettipartikkelitekniikka on käytännöllinen erottelumenetelmä, joka ei vaadi sentrifugointia, vaan tutkittava aine sidotaan partikkeleihin ja erotetaan matriksista magneettikentän avulla. Mikropartikkelit ja tutkittava molekyyli jäävät reaktioastiaan (kyvetiin) ja sitoutumattoman aineksen poistamisen jälkeen ne voidaan taas suspendoida liuokseen. (Wild & Kusnezow 2005, 183.)

Streptavidiini on proteiini, jossa on neljä sitoutumiskohtaa biotiinille. Näin ollen streptavidiinilla päällystettyjen magneettipartikkeleiden pinnalle voidaan sitoa biotinyloituja molekyyliä, kuten peptidejä. Streptavidiini-biotiinisysteemi on hyvin käyttökelpoinen työkalu immunologisissa määrittämissä, koska biotinylaatio ei laske käytettävän molekyylin biologista aktiivisuutta ja streptavidiini sitoo biotinyloituja molekyyliä hyvin selektiivisesti. (Kricka & Wild 2005, 205.) Tässä työssä tutkitavan vasta-aineen antigeenina toimii biotinyloitu peptidi. Peptideillä päällystettyihin magneettipartikkeleihin sitoutunut näytteen vasta-aine havaitaan leimatun sekundaarisen vasta-aineen avulla. Se on hiirissä tuotettu monoklonaalinen vasta-aine, joka sitoutuu ihmisen IgG-luokan vasta-aineisiin, ja johon on liitetty merkkiaineeksi akridiumiesteri. (Koivula 2006, 44.) Akridiumiesterit hajoavat emäksisissä olosuhteissa vetyperoksidin vaikutuksesta. Reaktiossa syntyy välituotteita, jotka hajoavat nopeasti lähettäen valoa. Tätä kemiallisesta reaktiosta syntyvää valoa kutsutaan kemiluminesenssiksi ja reaktiossa syntyvän valon voimakkuus mitataan luminometrin avulla. (Kricka & Wild 2005, 203–204.) IDS-iSYS-analysaattori ilmoittaa luminometriltä saadut tulokset RLU-arvoina (relative light unit).

Kuviossa 4 on esitetty kaavamaisesti tässä työssä käytetyn CLIA:n periaate. Näytteen sisältämät vasta-aineet sitoutuvat paramagneettisiin mikropartikkeleihin kiinnitettyyn antigeeniin, jonka jälkeen mikropartikkelit siirretään kyvetin reunaan magneetin avulla (A- ja B-kohdat). Kaikki sitoutumaton materiaali pestään pois ja magneettipartikkelien annetaan suspendoitua liuokseen, jossa on määritettävän vasta-aineen tunnistava sekundaarinen vasta-aine. Sekundaarisen vasta-aineen sitouduttua näytteen vasta-aineeseen sitoutumaton materiaali pestään pois. Lopuksi mitataan leiman tuottama kemiluminesenssi (C-kohta). Syntynyt valon määrä on suoraan verrannollinen tutkitavan vasta-aineen määrään näytteessä.

Inhibitio-CLIA toimii pääosin samalla periaatteella kuin edellä esitelty CLIA (josta myöhemmin käytetään nimitystä nolla-inhibitio-CLIA). Inhibitio-CLIA:ssa käytetään inhibiittorina magneettipartikkeliin sidottua peptidiä vastaavaa biotinyloimatonta peptidiä, joka pysyy liukoisena reaktioliuoksessa. Kuviossa 4 nähdään, että liukoista peptidiä lisätään reaktioastiaan jo määrittäksen alussa ja

näytteen vasta-aineiden annetaan sitoutua niihin (A-kohta). Tämän jälkeen lisätään magneettipartikkeleihin sidotut biotinyloidut peptidit. Näytteessä olevat autovasta-aineet voivat sitoutua joko inhibiittoripeptidiin tai biotinyloituun peptidiin, joten kyseessä on kilpaileva sitoutuminen. Ennen kemiluminesenssin mittausta kyvetistä pestään pois materiaali, joka ei ole sitoutunut magneettipartikkeleihin kiinnitettyihin peptideihin. Näin ollen myös liukoiset inhibiittoripeptidi-vasta-ainekompleksit poistuvat reaktioliuoksesta (B-kohta). Mitattu valon määrä on sitä pienempi, mitä enemmän vasta-aineet ovat sitoutuneet inhibiittoripeptidiin biotinyloidun peptidin sijaan.



KUVIO 4. IDS-iSYS-analysaattorille pystytettävän homositrullinivasta-aineita mittaavan CLIA:n ja inhibitio-CLIA:n periaate pelkistettynä (mukaillen: Koivula 2006, 45). Kuviossa antigeeninä toimivat peptidit vastaavat pääosin tyypin I kollageenin  $\alpha 1(I)$ -ketjun C-telopeptidiä ja niiden aminohappojärjestys on esitetty yksikirjaimisilla lyhenteillä (X = homositrulliini).



## 2.2.2 Entsyymireaktioon perustuva vasta-aineiden määrittäminen

Entsyymi-immunologisissa menetelmissä (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) yksi reaktioon osallistuvista komponenteista on sidottu kiinteään faasiin, esimerkiksi kuoppalevyn kaivojen pohjalle. Määritettävä analytti sitoutuu kiinteän faasin antigeeniin tai vasta-aineeseen ja sitoutuneen molekyylin määrä saadaan selville käyttämällä entsyymileimattua sekundaarista vastaainetta. Sitoutuneen entsyymin määrä voidaan mitata lisäämällä reaktioliuokseen entsyymin substraattia eli lähtöainetta sekä reaktiossa mahdollisesti tarvittavia kofaktoreita. Entsyymi katalysoi substraattia lopputuotteeksi, joka on värillinen tai fluoresoiva yhdiste ja siten helposti määritettävissä. Koska yksi entsyymi voi katalysoida lukuisten substraattimolekyylien muuttumisen tuotteeksi, entsyymi-immunomenetelmällä voidaan havaita hyvin pienet määrät tutkittavaa ainetta. Entsyyminä käytetään tyypillisimmin alkalista fosfataasia tai piparjuuriperoksidaasia. (Davies, 2005, 4; Kricka & Wild 2005, 194–195.)

Tämän opinnäytetyön vertailumenetelmänä käytetyssä inhibitio-ELISA:ssa kuoppalevyn kaivoihin on kiinnitetty streptavidini-molekyylejä. Niihin sidotaan biotinyloituja peptidejä, jotka toimivat menetelmässä antigeeninä tutkittavalle autovasta-aineelle. Inhibitio tapahtuu lisäämällä liukoinen inhibiittoripeptidi näytelaimennokseen puhtaalla kuoppalevyllä. Puolen tunnin inkuboinnin jälkeen tämä vasta-aineita sisältävä seerumi-inhibiittorilaimennos lisätään näytekäivoihin, vasta-aineiden annetaan sitoutua peptideihin ja sitoutumaton materiaali pestään pois. Liukoinen inhibiittori ja kuopan pohjaan sidottu peptidi kilpailevat vasta-aineen sitoutumisesta. Kuoppiin lisätään entsyymileimattua sekundaarista vastaainetta, joka kiinnittyy omaan antigeeniinsä eli seerumin vasta-aineeseen. Ylimääräinen leima pestään pois ja reaktioliuokseen lisätään vetyperoksidia, joka on entsyymileimana toimivan piparjuuriperoksidaasin substraatti. Kromogeenina käytetään TMB:tä (3, 3', 5, 5' -tetrametyylibentsidiini), joka on väritön yhdiste, mutta muuttuu värilliseksi tuotteeksi entsyymin katalysoimassa reaktiossa vetyperoksidin hapettaessa sen. Reaktio pysäytetään rikkihapon avulla ja lopullisen reaktiotuotteen määrä voidaan mitata spektrofotometrisesti. Mitattu värin intensiteetti on sitä vähäisempi, mitä paremmin inhibitio on toiminut eli vasta-aineet ovat sitoutuneet liukoiseen peptidiin biotinyloidun peptidin sijaan. (Koivula 2006, 46–47.)

## 2.3 Laboratoriomenetelmän validointi

Validointi on menettely, jonka avulla voidaan todeta analyttisen menetelmän sopivuus käyttötarkoitukseensa. Se on tärkeä suorittaa, jotta menetelmällä saatuihin tuloksiin voidaan luottaa. Vali-

dointi liittyy tiiviisti uuden laboratoriomenetelmän kehitysvaiheeseen ja joskus sitä on vaikeaa eriyttää menetelmän kehittämisestä. Uuden menetelmän kehittämisen lisäksi validointi on tarpeen esimerkiksi silloin, kun käytössä olevaa menetelmää uudistetaan, muutetaan tai sen käyttötarkoitusta laajennetaan esimerkiksi näytetyypin tai analyysin suhteen. (Ehder 2005, 25–26.)

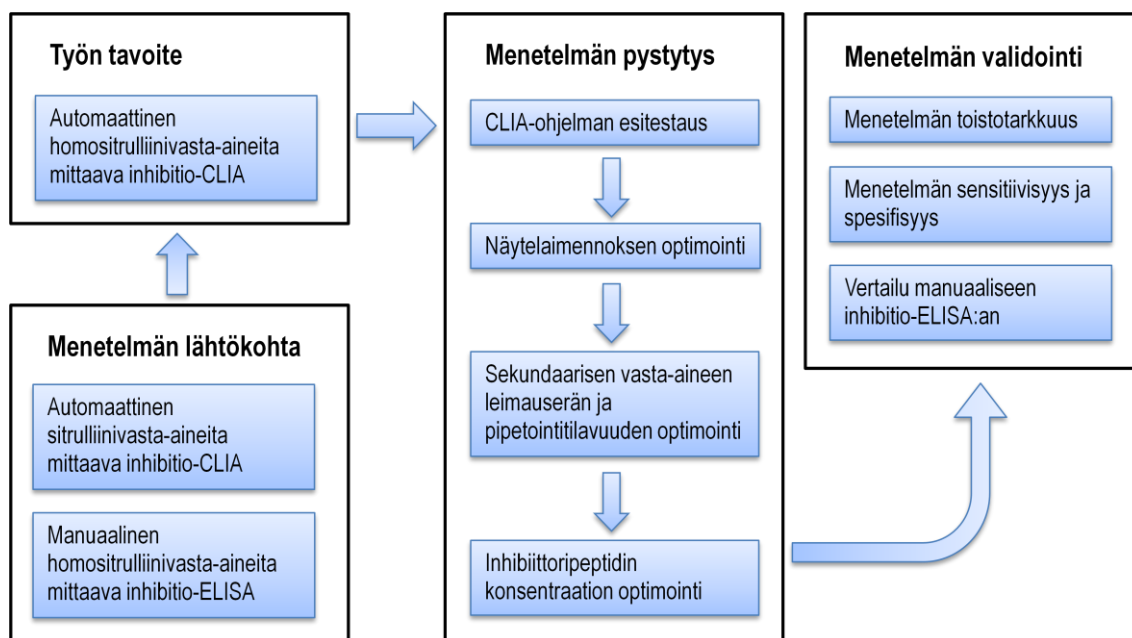
Kemiallisen menetelmän validoinnissa tutkitaan useita mittausmenetelmän suorituskykyä ilmaisevia parametrejä. Näitä ovat muun muassa menetelmän spesifisyys, sensitiivisyys ja toistettavuus. Sensitiivisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä määrittää tarkasti juuri tiettyä analyttiä näyttematriisin muiden komponenttien joukosta. Spesifisessä menetelmässä muut aineet eivät häiritse ja se mittaa analysoitavaa ainetta täysin selektiivisesti. Tarkkuus on menetelmän kyky antaa lähellä tosiarvoa olevia tuloksia. (Ehder 2005, 27–35.) Jos analytti on uusi eikä sille ole saatavilla tarkasti tietyn pitoisuuden omaavia kontrollinäytteitä, menetelmän tarkkuutta on mahdoton määrittää. Esimerkiksi toistettavuus on kuitenkin myös tällaisessa tilanteessa määritettävissä. Toistettavuus eli toistotarkkuus kuvaa sitä, kuinka lähellä samasta näytteestä tehdyt rinnakkaismääritykset ovat toisiaan. Sitä voidaan tutkia tekemällä useita rinnakkaismäärityksiä eri analyttipitoisuuden sisältävistä näytteistä. Yleensä näytesarjojen sisäinen vaihtelu on pienempää kuin niiden välinen vaihtelu, sillä esimerkiksi lämpötila tai näytteen homogeenisyys voivat vaihdella hieman analyysisarjojen välillä. (Ehder 2005, 37.)

Biologiset näytteet asettavat validointiprosessille useita haasteita ja rajoituksia. On huomioitava näyttematriisin vaikutus tuloksiin, sillä esimerkiksi seeruminäyte voi sisältää eri henkilöillä erilaisia määritystä häiritseviä tekijöitä. Toisaalta moniin testauksiin on vaikeaa, ellei jopa mahdotonta saada kattavaa validointimateriaalia. Validoinnin kattavuus on riippuvainen menetelmän käyttöalueen asettamista tarpeista, koska sen tarkoituksena on todeta, toimiiko laite tai menetelmä aiotua tarkoitusta varten riittävän luotettavasti. Esimerkiksi kliinisen mikrobiologian analyysimenetelmien validoinnissa käytetään soveltaen seuraavia parametrejä: sensitiivisyys eli herkkyys, spesifisyys eli tarkkuus, toistettavuus ja uusittavuus. (Heikkilä 2008, hakupäivä 19.12.2011.)

Tässä opinnäytetyössä validointiparametreiksi on valittu toistotarkkuus, sensitiivisyys ja spesifisyys. Kliininen sensitiivisyys ja spesifisyys kuvaavat diagnostisen testin kykyä erotella sairaat ja terveet totuudenmukaisesti positiivisin ja negatiivisin testituloksin. Kliininen sensitiivisyys kertoo analyysimenetelmällä positiivisen testituloksen saaneiden osuuden kaikista todellisesti sairaista potilaista. Kliinisellä spesifisyydellä taas tarkoitetaan menetelmällä negatiivisen testituloksen saaneiden osuutta kaikista todellisesti terveistä henkilöistä. (Kairisto 2010, 41–43.)

### 3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Opinnäytetyön laboratorio-osuus tehtiin Oulun yliopiston Diagnostiikan laitoksen Kliinisen kemian laboratoriossa kesällä 2011. Kuviossa 5 on esitetty työn lähtökohdat ja sen eteneminen pääpiirteittäin. Työn tavoitteina oli jo aikaisemmin toimivaksi todetun homositrulliinivasta-aineita mittaavan inhibitio-ELISA:n kehittäminen inhibitio-CLIA:ksi automaattiselle analysaattorille ja kehitetyn menetelmän validointi. Kehitystyö tapahtui IDS-iSYS-analysaattorille aiemmin pystytettyä sitrulliinivasta-aineita mittaavaa inhibitio-CLIA-ohjelmaa muokkaamalla. Menetelmän optimointivaiheessa valittiin optimaalinen näytelaimennos sekä optimaaliset pitoisuudet sekundaariselle vasta-aineelle ja liukoiselle inhibiittoripeptidille laimennossarjoista saatujen tulosten perusteella. Laadituilla ohjelmilla määritettiin potilas- ja kontrolliaineistoista homositrulliinivasta-aineet ja saatuja tuloksia verrattiin manuaalisen inhibitio-ELISA:n antamiin tuloksiin. Analyysisarjoissa mukana olleiden laatukontrollinäytteiden perusteella analysoitiin menetelmän toistotarkkuus. Potilas- ja kontrolliaineistojen perusteella analysoitiin tilastollisesti menetelmän sensitiivisyys ja spesifisyys.



KUVIO 5. Opinnäytetyön tavoite, lähtökohta ja työvaiheet

### 3.1 Lähtökohtainen inhibitio-CLIA-ohjelma

Homositrulliinivasta-aineita mittaavan inhibitio-CLIA:n lähtökohtana pidettiin IDS-iSYS-analysaattorille pystytettyä sitrulliinivasta-aineita määrittävää analyysiohjelmaa (Koivula ym., julkaisematon käsikirjoitus). Kyseisen analyysiohjelman vaiheet on kuvattu taulukossa 1. Vastaavalla inhibitio-CLIA on suurimmaksi osaksi täysin samanlainen taulukossa kuvatun inhibitio-ohjelman kanssa, mutta siinä pipetoidaan ensimmäisessä vaiheessa 100 µl assay-puskuria (liite 1) inhibiittorin sijaan. Koska määritettävät vasta-aineet ja antigeenina käytettävät synteettiset peptidit vaihdettiin lähtökohtaiseen ohjelmaan verrattuna, optimoitiin analyysiohjelmasta liukoisen inhibiittoripeptidin konsentraatio, näytelaimennos sekä leimatun sekundaarisen vasta-aineen pipetointitilavuus. Magneettipartikkelien määrä, inhibitioaika ja muut inkubaatioajat oli testattu toimiviksi jo aiemmin opinnäytetyön toimeksiantajan tutkimusryhmässä, joten niitä ei ollut tarpeen optimoida uudelleen. Myös pesu- ja sekoitustyytit sekä kemiluminesenssin mittauksessa käytettyjen trigger-liuosten pipetointi oli valmiiksi optimoitu. (Koivula, Ramberg, Åman, Karjalainen, Hakala & Risteli 2005; Koivula ym. julkaisematon käsikirjoitus.) Sekundaarista vasta-ainetta oli käytettävissä kolmea eri leimauserää, joita vertailemalla valittiin homositrulliinivasta-aineiden mittauksessa parhaiten toimiva erä.

TAULUKKO 1. Sitrulliinivasta-aineita mittaavan inhibitio-CLIA-ohjelman vaiheet IDS-iSYS-analysaattorilla (Koivula ym. julkaisematon käsikirjoitus)

Vaihe	Analysaattorin suorittamat toiminnot
1.	Pipetointi: 100 µl liukoista inhibiittoripeptidiä (100 µg/ml)
2.	Pipetointi: 10 µl näytettä + 1800 sekunnin inkubaatio + sekoitus
3.	Pipetointi: 15 µl magneettipartikkeleita (4 µg/ml) + 630 sekunnin inkubaatio + sekoitus
4.	Pesu
5.	Pipetointi: 250 µl leimattua sekundaarista vasta-ainetta (50 µl/100 ml, erä AC3) + 630 sekunnin inkubaatio + sekoitus
6.	Pesu
7.	Luminesenssin mittaus (RLU)

### 3.2 Käytetyt reagenssit

Homositrulliinivasta-aineiden määrittämisessä käytettiin sekä valmiita kaupallisia reagensseja että itse valmistettuja liuoksia. Määrittämiä varten tarvittiin biotinyloituja ja biotinyloimattomia synteettisiä peptideitä, streptavidiinilla päällystettyjä magneettipartikkeleita ja leimattua sekundaarista vasta-ainetta. Työskentelyn eri vaiheissa käytettiin useita työn toimeksiantajan laboratoriossa valmistettuja puskuriliuoksia. Reagensseista ja liuoksista kerrotaan tarkemmin seuraavissa luvuissa.

#### 3.2.1 Kaupalliset reagenssit ja triggerit

IDS-iSYS-analysaattori käyttää immunomäärittämissä systeemi- ja pesuliuoksia sekä trigger-liuos A:ta ja B:tä. Systeemiliuosta tarvitaan analysaattorin nestetilojen huuhtelu- ja pesuvaiheissa. Pesuliuosta käytetään magneettipartikkelien huuhteluun immunomäärittäksen pesuvaiheissa. Trigger A sisältää happamaan liuokseen laimennettua vetyperoksidia ja trigger B on laimeaa natriumhydroksidia. Analyysiohjelman siirtyessä viimeiseen vaiheeseen analysaattori pipetoi automaattisesti trigger-liuokset reaktiokyvetiin. Tällöin sekundaariseen vasta-aineeseen liitetty akridiumiesteri virittyy ja emittoi normaalitilaan palatessaan valoa, jonka luminometri mittaa ja ilmoittaa RLU-arvona. (Immunodiagnostic Systems France 2010, 12.)

Analysaattorin moitteeton toiminta tarkistettiin joka aamu ennen näytteiden analysointia CCS-testien (Cartridge Checking System) avulla. Niihin tarvittiin edellä mainittujen reagenssien lisäksi myös kaupallinen CCS-kasetti, jossa on laadunvarmistukseen tarvittavat reagenssipullot. CCS-testeihin kuuluu muun muassa pipetointikäsivarren ja pesurien toiminnan tarkistaminen sekä tyhjän kyvetin taustasignaalin mittaaminen. (Immunodiagnostic Systems France 2010, 43, 116.)

#### 3.2.2 Synteettiset peptidit ja magneettipartikkelit

Inhibitio-CLIA:ssa käytettiin kahta synteettistä homositrullinisoitua peptidiparia (taulukko 2). SP132- ja SP135-peptidien aminohappojärjestys vastasi pääosin tyypin I kollageenin  $\alpha 1(I)$ -ketjun C-telopeptidiä, joka käsittää aminohapot 1193–1218 koko ketjusta. SP109- ja SP136-peptidien aminohappojärjestys vastasi tyypin II kollageenin  $\alpha 1(II)$ -ketjun C-telopeptidiä, joka muodostuu kyseisen ketjun aminohapoista 1215–1241. Synteettisissä peptideissä oli korvattu C-telopeptidin toiseksi viimeinen aminohappo arginiini homositrulliinilla. SP135 ja SP136 olivat lyhyempiä kuin parinsa, vain 12 aminohapon peptidejä. Pitempien SP132- ja SP109-peptidien aminotermiini-

seen päähän oli liitetty biotiini. Analyysimenetelmissä antigeeneinä toimivat biotinyloidut peptidit kiinnitettiin streptavidiinilla päällystettyihin magneettipartikkeleihin (Dynabeads® M-280 Streptavidin, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norja). Lyhyemmät biotinyloimattomat peptidit pysyivät liukoisena toimien menetelmässä inhibiittoreina. Kaikki työssä käytetyt synteettiset peptidit oli tilattu erikoisvalmisteisena PolyPeptide Group -yritykseltä (Polypeptide Laboratories France SAS, Strasbourg, Ranska). Tyypin I -peptideihin viitataan myöhemmin lyhenteellä HTELO-I ja tyypin II -peptideistä käytetään lyhennettä HTELO-II.

TAULUKKO 2. Homositrulliinivasta-aineita mittaavassa inhibitio-CLIA:ssa käytetyt synteettiset peptidit

Nimi	Aminohappojärjestys	Vastaavan kollageenityypin C-telopeptidi
SP132	Biotiini-Ser-Ala-Gly-Phe-Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg-Tyr-Tyr-Homositrulliini-Ala	Tyypin I
SP135	Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg-Tyr-Tyr-Homositrulliini-Ala	
SP109	Biotiini-Gly-Ile-Asp-Met-Ser-Ala-Phe-Ala-Gly-Leu-Gly-Pro-Arg-Glu-Lys-Gly-Pro-Asp-Pro-Leu-Gln-Tyr-Met-Homositrulliini-Ala	Tyypin II
SP136	Glu-Lys-Gly-Pro-Asp-Pro-Leu-Gln-Tyr-Met-Homositrulliini-Ala	

Optimointivaiheessa kuluviin reagenssien määriä ei voitu etukäteen tietää tarkasti, joten magneettipartikkeleita jouduttiin päällystämään peptideillä kolme erää. Käyttövalmiin magneettipartikkelisuspension konsentraatio oli 2 mg/ml. Päällystäminen aloitettiin sekoittamalla kaupallista 10 mg/ml partikkelisuspensiota pullonpyörittäjässä, kunnes se oli homogeenistä. Halutun lopputilavuuden mukaisesti pipetoitiin tarvittava määrä magneettipartikkeleita pieneen dekantterilasiiin (esimerkiksi 600 µl, kun haluttiin 3 ml:aa 2 mg/ml suspensiota). Magneettipartikkelit pestiin kolmeen kertaan lopputilavuutta vastaavalla määrällä EIA-yleispuskuria (liite 1). Pesujen välissä partikkelit kerättiin dekantterilasin pohjalle pienen magneetin avulla ja käytetty pesuliuos poistettiin pasteuripetillä. Biotinyloiduista peptideistä valmistettiin EIA-yleispuskuriin 4 µg/ml liuokset, joiden tilavuus oli noin 6,6-kertainen halutun magneettipartikkelisuspension lopputilavuuteen nähden. Varsinaisessa päällystysvaiheessa magneettipartikkelit laimennettiin peptidiliuoksiin ja liuos inkuboitiin 37 °C lämpösekoittajassa kahden tunnin ajan. Sekoitus säädettiin sopivaksi niin, että suspensio oli koko ajan pienessä liikkeessä, eivätkä magneettipartikkelit päässeet laskeutumaan astian pohjalle. Tämän jälkeen liuoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi, peptideillä

päälystetyt magneettipartikkelit kaapattiin magneetilla ja puskuri poistettiin pasteuripetillä. Suoritettiin vielä kolme kertaa pesu EIA-yleispuskurilla kuten alussa ja lisäksi yksi pesu PBSB-puskurilla (liite 1). Lopuksi magneettipartikkelit suspensoitiin PBSB-liuokseen ja suspensiota pipetoitiin IDS-iSYS-analysaattorin 3 ml:n pulloihin. Kussakin optimointivaiheessa käytettiin alusta loppuun samaa magneettipartikkelierää, kuten myös potilasaineistojen määityksessä.

### **3.2.3 Sekundaarinen vasta-aine**

Sekundaarisena vasta-aineena käytettiin hiiressä tuotettua monoklonaalista vasta-ainetta, joka sitoutuu spesifisesti ihmisen IgG-luokan vasta-aineisiin (Mouse monoclonal anti-human IgG, Medix Biochemica, Kauniainen, Suomi). Sekundaarinen vasta-aine oli leimattu akridiumiesterillä (acridium-4'-NHS in dimethylformamide, Immunodiagnostic Systems) työn toimeksiantajan tutkimusryhmässä jo aiemmin (Häyrynen 2010, 26–28). Tässä työssä testattiin kolmen eri leimauserän toimivuutta. Pakastetuista (-20 °C) kantaliuoksista tehtiin 50 µl/100 ml laimennos AC-puskuriin (liite 1). Valmista liuosta säilytettiin jääkaapissa valolta suojattuna. Menetelmän pystytyksen eri vaiheissa käytettiin alusta loppuun samalla kertaa tehtyä leimalaimennosta, jotta eri päivinä saadut tulokset olisivat keskenään vertailukelpoisia. Menetelmän validointivaiheessa käytettiin myös koko ajan samaa leimalaimennosta.

## **3.3 Menetelmän pystytys**

Ennen varsinaisten optimointivaiheiden alkua lähtötilanteena olevan sitrulliinivasta-aineiden mittaamiseen kehitetyn analyysiohjelman toimivuus tarkistettiin molemmilla homositrullinisoiduilla peptidipareilla. Testausvaiheessa käytettiin neljää laatukontrollinäytettä, joista tehtiin kaksi rinnakkaista määritystä sekä nolla-inhibitio- että inhibitio-ohjelmilla. Menetelmä näytti toimivan molemmilla peptidipareilla hyvin, joten optimointiin käytettiin vain toista peptidiparia ja ohjelman testauksen perusteella tähän valittiin HTELO-II.

### **3.3.1 Näytelaimennoksen optimointi**

Ensimmäisessä optimointivaiheessa tutkittiin sitä, onko analyysiohjelmaan tarpeen lisätä näytteen esilaimennosta. Testauksessa käytettiin neljää laatukontrollia (blank, matala, keskitaso ja korkea), joiden likimääräiset homositrulliinivasta-ainetasot olivat tiedossa. Blank eli nollanäyte sisälsi

pelkkää assay-puskuria ja matala kontrollinäyte oli nivelreuman suhteen terveen henkilön seerumia. Keskitason kontrollina toimi Oulun yliopistollisessa sairaalassa käytössä oleva kontrolliseerumi (IK56), joka on koottu lukuisten potilaiden seeruminäytteiden ylijääneistä osista ja sisältää myös nivelreumapotilaiden seerumia. Korkea kontrollinäyte oli nivelreumapotilaan seerumia, jota oli laimennettu suhteessa 1/4 assay-puskurilla, sillä sen homositrulliinivasta-ainepitoisuus oli hyvin korkea.

Näytelaimennosten testausta varten matala, keskitaso ja korkea laatukontrolli laimennettiin suhteissa 1/10, 1/20, 1/40, ja 1/80, jonka jälkeen niistä sekä nollanäytteestä tehtiin kaksi rinnakkaista määrittystä nolla-inhibitio- ja inhibitio-ohjelmilla. Rinnakkaismäärittysistä laskettiin keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet. Keskiarvojen avulla laskettiin kullekin määrittyselle inhibitioprosentti. Inhibition määrä laskettiin vähentämällä nolla-inhibitio-tuloksesta inhiboidun määrittymisen tulos, jakamalla erotus nolla-inhibitio-tuloksella ja kertomalla tulos sadalla. Tulosten perusteella päätettiin tehdä vielä lisämäärittys laimennoksilla 1/2 ja 1/5 ja lopulliseen vertailuun otettiin mukaan myös ohjelman testauksesta saadut tulokset laimentamattomalle näytteelle. Määrittys tehtiin kolmen päivän aikana ja käytössä oli koko ajan samat reagenssierät.

### **3.3.2 Sekundaarisen vasta-aineen leimauserän ja pipetointitilavuuden optimointi**

Akridiumiesterillä leimattua sekundaarista vasta-ainetta oli käytettävissä kolmea leimauserää. Kaikki erät testattiin erilaisilla pipetointitilavuuksilla, jotta löydettiin parhaiten homositrulliinivasta-aineiden mittaukseen soveltuva leimauserä ja optimaalinen leiman määrä. Testauksessa käytettiin nollanäytettä ja keskitason laatukontrollia, jotka analysoitiin kymmenenä rinnakkaisena määrittymänä pipetointitilavuuksilla 150 µl, 200 µl ja 250 µl. Tulokset taulukoitiin ja rinnakkaisten määrittysten RLU-arvoista laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin. Tuloksista piirrettiin myös kuvaajat.

Saatujen tulosten perusteella tehtiin vielä lisämäärittys leimauserällä AC1 ja pipetointitilavuudella 300 µl. AC3-leimauserällä tehdyt määrittymiset täytyi uusida pipetointitilavuudella 200 µl, koska analysaattorilla oli ilmeisesti ollut ongelmia sekundaarisen vasta-aineen pipetoinnissa ja tästä leimauserästä saadut tulokset olivat epäjohtonmukaisia. Luvussa 4.1.2 esitetyissä tuloksissa on mukana vain uusitun ajon tulokset.



### 3.3.3 Inhibiittoripeptidin konsentraation optimointi

Liukoisen inhibiittoripeptidin pipetointilavuus haluttiin pitää samana kuin se oli lähtötilanteessa eli sitrulliinivasta-aineita mittaavassa analyysiohjelmassa. Ensimmäisessä vaiheessa pipetoitavan inhibiittorin tilavuuden muuttaminen vaikuttaisi myös seuraavissa vaiheissa lisättävien näytteen ja magneettipartikkelien konsentraatioon reaktioliuoksessa, mikä voisi häiritä niiden keskinäistä sitoutumista. Näin ollen inhibiittorin optimaalista määrää reaktioliuoksessa tutkittiin tekemällä määrittäyksiä erilaisilla inhibiittoripeptidin konsentraatioilla, pipetointilavuuden pysyessä vakiona (100 µl).

Neljästä laatukontrollinäytteestä (blank, matala, keskitaso ja korkea) tehtiin kaksi rinnakkaismäärittystä sekä nolla-inhibitio- että inhibitio-ohjelmilla seuraavilla inhibiittorin konsentraatioilla (µg/ml): 200; 100; 50; 25; 12,5 ja 0. Inhibiittoripeptidi laimennettiin assay-puskuriin ja valmiit liuokset säilytettiin jääkaappilämpötilassa. Tuloksista laskettiin keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet rinnakkaismäärittäyksille. Konsentraatio 0 µg/ml tarkoittaa pelkkää puskuriliuosta, joten sillä tehdyt määrittäykset vastaavat nolla-inhibitio-menetelmää ja niiden avulla voitiin laskea muille määrittäyksille inhibitioprosentit. Lopuksi tuloksista piirrettiin kuvaajat.

### 3.4 Pystytetyn menetelmän validointi

Viimeinen laboratoriotyövaihe oli pystytetyn menetelmän validointi. Tämä tehtiin nivelreumapotilaiden ja terveiden kontrollien seeruminäytteiden sekä näytteiden määrittäyssarjoissa mukana olleiden laatukontrollien avulla. Ennen aineistojen analysointia pystytetyn menetelmän toimivuus molemmilla peptidipareilla testattiin määrittämällä laatukontrollit kahtena rinnakkaisena sekä inhibitio- että nolla-inhibitio-ohjelmilla.

#### 3.4.1 Potilas- ja kontrolliaineisto

Nivelreumapotilaiden seeruminäytteet olivat peräisin Keski-Suomen keskussairaalasta ja tutkimusryhmän käyttöön ne oli luovuttanut professori Pekka Hannunen. Kyseisestä 80 seeruminäytteen aineistosta saatiin määritettyä 68 potilaan homositrulliinivasta-aineet, koska osassa saaduista näytteistä oli jäljellä liian vähän seerumia analysaattorilla määritettäväksi. Nivelreuman suhteen terveiden henkilöiden seeruminäytteet oli kerätty Oulun yliopistollisesta sairaalasta. Myös kontrollinäytteitä oli alun perin 80, mutta näytteiden niukkuuden vuoksi niistä voitiin analysoida 64 kap-

paletta. Potilas- ja kontrollinäytteistä määritettiin sekä tyypin I että tyypin II kollageenien homositrullinisoituihin C-telopeptideihin sitoutuvat autovasta-aineet. Määritykset tehtiin sekä inhibitiiohjelmailla ja tuloksista laskettiin keskiarvot sekä inhibitioprosentit.

### 3.4.2 Laatuksentrollit

Näytteiden homositrullinivasta-ainepitoisuuksia määritettäessä analyysisarjoihin liitettiin aina mukaan nollanäyte ja kolme eritasoista laatuksentrollia: matalan, keskitason ja korkean tuloksen antavat tunnetut näytteet. Laatuksentrollien avulla oli mahdollista havaita esimerkiksi reagenssien laimentamisessa tapahtuneet virheet tai muut laitteen toiminnasta riippumattomat inhimilliset virheet. Kontrolleista tehtiin päivittäin kolme rinnakkaista määrittystä, joista laskettiin RLU-tulosten keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin. Tulokset taulukoitiin ja niiden avulla pystyttiin arvioimaan sekä analyysisarjojen sisäistä että niiden välistä vaihtelua.

### 3.5 Tilastolliset menetelmät

Mittaustuloksista saatu informaatio voidaan pelkistää muuttujia kuvaaviin tunnuslukuihin, jolloin osa informaatiosta häviää, mutta suurtenkin aineistojen sisältämä tieto saadaan tiivistettyä. Tässä opinnäytetyössä käytettiin tunnuslukuina keskiarvoa (ka.), keskihajontaa (Standard Deviation, SD) ja variaatiokerrointa (Coefficient of Variation, CV). Suuressa aineistossa keskiarvo on vakaa suure, mutta ääriarvojen vaikutus siihen on suurta, jos havaintojen määrä on pieni. Keskihajonta on eniten käytetty ja tärkein hajonnan mittari. Jos mittaustulokset ovat hyvin lähellä toisiaan, keskihajonta saa pieniä arvoja ja keskiarvosta huomattavasti poikkeavat arvot taas kasvattavat keskihajontaa. SD siis kuvaa sitä, kuinka hajallaan tulokset ovat keskiarvon ympärillä. Variaatiokerroin kuvaa aineiston suhteellista hajontaa, eli sen avulla voidaan vertailla eri mittayksikköä käyttävien muuttujien arvojen hajontaa. Yleensä variaatiokerroin ilmoitetaan prosentteina, jolloin sen laskukaava on  $SD / ka. \times 100 \%$ . (Heikkilä 2008, 82–88.) Se on kliinisessä kemiassa yleisesti käytetty hajontaluku laboratoriomenetelmien vertailuun.

Inhibitiio-CLIA:n ja inhibitiio-ELISA:n välistä riippuvuutta tutkittiin tilastollisesti Pearsonin korrelaatiokertoimen ja Passing-Bablok-regressioanalyysin avulla. Menetelmien vertailussa käytettiin kontrolli- ja nivelreumapotilaiden näytteille laskettuja inhibitioprosentteja ja tilastoanalyysit suoritettiin Analyse-it Method Evaluation edition -ohjelmalla (Analyse-it Software, Ltd., Leeds, Iso-

Britannia). Pearsonin korrelaatiokertoimen  $r$  arvo voi olla lukujen  $-1$  ja  $+1$  välillä, ja kertoimen etumerkki osoittaa muuttujien välisen riippuvuuden suunnan. Kertoimen arvo nolla tarkoittaa, että muuttujien välillä ei ole lineaarista riippuvuutta. (Uhari & Nieminen 2001, 166–167.) Menetelmien välinen riippuvuus eli korrelaatio on siis sitä suurempaa, mitä yhdenmukaisempia niiden antamat tulokset ovat toisiinsa nähden. Mitä lähempänä lukua  $+1$  korrelaatiokerroin on, sitä suurempi positiivinen riippuvuus menetelmien välillä on. Passing-Bablok-analyysistä saadaan tulokseksi regressiosuora, jonka kulmakertoimen ja leikkauspisteen arvot kuvaavat testattavan menetelmän systemaattista virhettä referenssimenetelmään nähden. Käytännössä tulosten tarkastelu tehdään edellä mainittujen parametrien 95 % luottamusvälien (Confidence Interval, CI) avulla. Jos kulmakertoimen luottamusväli sisältää arvon yksi ja leikkauspisteen luottamusväli arvon nolla, tutkittujen menetelmien välillä on voimakas lineaarinen korrelaatio. (Bilić-Zulle 2011, 50.)

Kontrollipotilaiden seerumeista mitattujen inhibitioprosenttien avulla määritettiin viiterajat HTELO-I ja HTELO-II -määrittäyksille. Viiterajat ovat yleensä terveiden henkilöiden väestötoksesta saatujen tulosten jakauman 2,5 % ja 97,5 %:n rajoja. Normaalisti jakautuneessa aineistossa nämä rajat vastaavat keskiarvosta noin kahden keskihajonnan verran poikkeavia arvoja (Kairisto 2010, 36). Rajoja määritettäessä kaikki aineistoissa esiintyvät negatiiviset inhibitiotulokset muutettiin ensin nollassi, koska niillä ei ole kliinistä merkitystä. Aineistoille laskettiin keskiarvot ja keskihajonnat, jonka jälkeen keskiarvosta yli  $3 \times \text{SD}$ :n verran poikkeavat tulokset hylättiin selvästi poikkeavina. Jäljelle jääneiden tulosten avulla laskettiin aineistoille uudet keskiarvot ja keskihajonnat, jonka jälkeen viiteraja määritettiin kaavalla: keskiarvo +  $2 \times \text{SD}$ . Inhibitiota mitattaessa ei voida määrittää viitearvojen alarajaa, koska inhibition ollessa nolla potilaalla ei ole kyseisiä vasta-aineita. Näin ollen käytettiin vain viitearvojen ylärajaa erottelemaan testin suhteen negatiiviset ja positiiviset potilaat toisistaan.

Viiterajojen avulla luokiteltiin kontrolli- ja nivelreumapotilaat homositrulliinivasta-aineiden suhteen negatiivisiin ja positiivisiin. Tämän jälkeen voitiin analysoida homositrulliinivasta-aineita mittaavien inhibitiio-CLIA:ien kliinistä käyttökelpoisuutta Receiver operating characteristic (ROC) -analyysin avulla. Referenssimenetelmänä käytettiin manuaalista inhibitiio-ELISA:a, jolla oli aikaisemmin analysoitu tässä työssä käytetyt aineistot samoja peptidipareja antigeenina käyttäen. ROC-kuvaajassa esitetään y-akselilla testattavan menetelmän antamat todelliset positiiviset tulokset (sensitiivisyys) ja x-akselilla väärät positiiviset tulokset ( $1 - \text{spesifisyys}$ ). Käyrän alle jäävä pinta-ala kertoo, kuinka todenmukaisesti menetelmä jakaa aineiston kahteen luokkaan. Menetelmä jakaa aineiston luokkiin täysin sattumanvaraisesti, jos käyrän alle jäävä pinta-ala on 0,5. Mitä lä-

hempänä ROC-käyrän alle jäävä pinta-ala on arvoa yksi, sitä luotettavampi menetelmä on. (Fawcett 2006, 868.) Myös käyrän muodolla on merkitystä: mitä lähempänä käyrä kulkee kuvan vasenta ylänurkkaa, sitä sensitiivisempi ja spesifisempi testattu menetelmä on. ROC-analyysi tehtiin SPSS Statistics for Windows -ohjelman versiolla 19 (IBM, New York, USA).

RA-potilasaineiston ristiintaulukoinnin avulla selvitettiin, jakavatko inhibitio-CLIA ja inhibitio-ELISA aineiston yhdenmukaisesti positiivisiin ja negatiivisiin, eli onko menetelmien välillä kliinistä riippuvuutta. Myös inhibitio-CLIA:lla eri peptidipareja käyttäen saatuja tuloksia vertailtiin toisiinsa. Riippuvuuden tilastollista merkitsevyyttä selvitettiin ristiintaulukoinnin yhteydessä khiin neliötestin avulla. Se mittaa muuttujien välistä riippumattomuutta ja sen tuloksesta voidaan johtaa tilastollista merkitsevyyttä osoittava riskitaso (probability,  $p$ ), joka kertoo kuinka suurella riskillä havaittu riippuvuus johtuu sattumasta. Yleisesti käytetyt riski- eli merkitsevyystasot ovat 0,05 (melkein merkitsevä), 0,01 (merkitsevä) ja 0,001 (erittäin merkitsevä). (Heikkilä 2008, 194–195.) Khiin neliötestin avulla saatu merkitsevyystaso ei aina kuvaa havaitun riippuvuuden voimakkuutta. Sen vuoksi laskettiin myös kontingenssikerroin (Contingency Coefficient,  $C$ ), joka perustuu khiin neliötestiin ja ilmaisee riippuvuuden voimakkuuden. Kontingenssikertoimen arvo on aina nollan ja ykkösen välillä. Maksimiarvo riippuu kuitenkin ristiintaulukoinnin rivien ja sarakkeiden määrästä, joten se on vertailukelpoinen vain samankokoisilla taulukoilla. Esimerkiksi 2 x 2 -taulukossa suurin mahdollinen arvo on noin 0,7. Yleisesti voidaan tulkita alle 0,3 suuruisten kertoimien tarkoittavan vähäistä riippuvuutta,  $C$ :n arvojen 0,3–0,6 kertovan kohtalaisesta riippuvuudesta ja  $C$ :n ollessa yli 0,6 riippuvuuden voidaan todeta olevan voimakasta. (Heikkilä 2008, 221.) Edellä mainitut tilastolliset analyysit tehtiin SPSS Statistics for Windows -ohjelman versiolla 19 (IBM, New York, USA).

## 4 TULOKSET

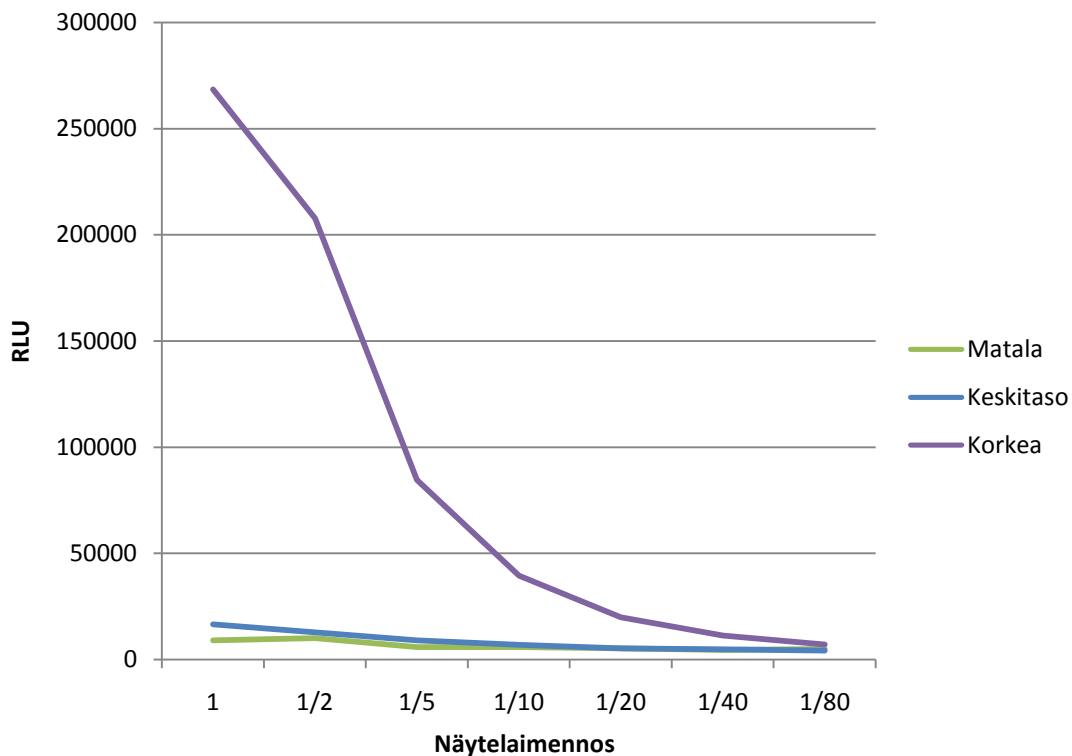
### 4.1 Homositrullinivasta-aineita mittaavan inhibiatio-CLIA:n pystytys

Homositrullinivasta-aineiden määrittystä varten pystytettävä menetelmä perustuu vastaavaan sitrullinivasta-aineita mittaavaan menetelmään. Tämän vuoksi analyysiohjelmassa muuttumattomana pysyviä tekijöitä, kuten magneettipartikkelien määrää ja inkubaatioaikoja, ei ryhdytty toistamiseen optimoimaan. Pystytettävä menetelmä optimoitiin näytelaimennoksen, leimatun sekundaarisen vasta-aineen ja liukoisen inhibiittorin osalta.

Lähtökohtaisen ohjelman esitestauksen perusteella ohjelma näytti soveltuvan myös homositrullinivasta-aineiden mittaamiseen, sillä kontrollinäytteiden RLU-arvot kasvoivat molemmilla peptidipareilla tehdyissä mittauksissa järjestyksessä blank, matala, keskitaso ja korkea. Korkean vasta-ainepitoisuuden sisältävälle kontrollille saatiin inhibitioprosentiksi HTELO-I-peptidiparilla 88,1 ja HTELO-II-peptidiparilla 93,2. Optimointivaiheeseen valittiin tämän perusteella HTELO-II-peptidit.

#### 4.1.1 Näytelaimennoksen optimoinnin tulokset

Laatukontrollinäytteiden laimennossarjasta CLIA:lla mitatut tulokset on esitetty kuviossa 6. Näytteet ajettiin kahtena rinnakkaisena määrittäksenä ja tulokset ovat näiden keskiarvoja. Kun tarkastellaan laatukontrollia, jossa on korkea pitoisuus määritettävää vasta-ainetta, havaitaan mitatun luminesenssin pienenevän jatkuvasti näytettä laimennettaessa. Matalan ja keskitason kontrolleilla RLU-arvot ovat laimennossuhteilla 1/80–1/20 samalla tasolla nollanäytteen kanssa (blank: RLU = 4855). Kyseisillä kontrolleilla arvot kasvavat selkeästi vasta laimennoksesta 1/10 lähtien laimentamatonta näytettä kohti. Matalan ja keskitason kontrollien tulokset eroavat toisistaan selkeimmin laimentamatonta näytettä käytettäessä.



KUVIO 6. HTELO-II-peptidiparia hyödyntävällä CLIA:lla mitatut tulokset laatukontrollinäytteiden laimennossarjoille

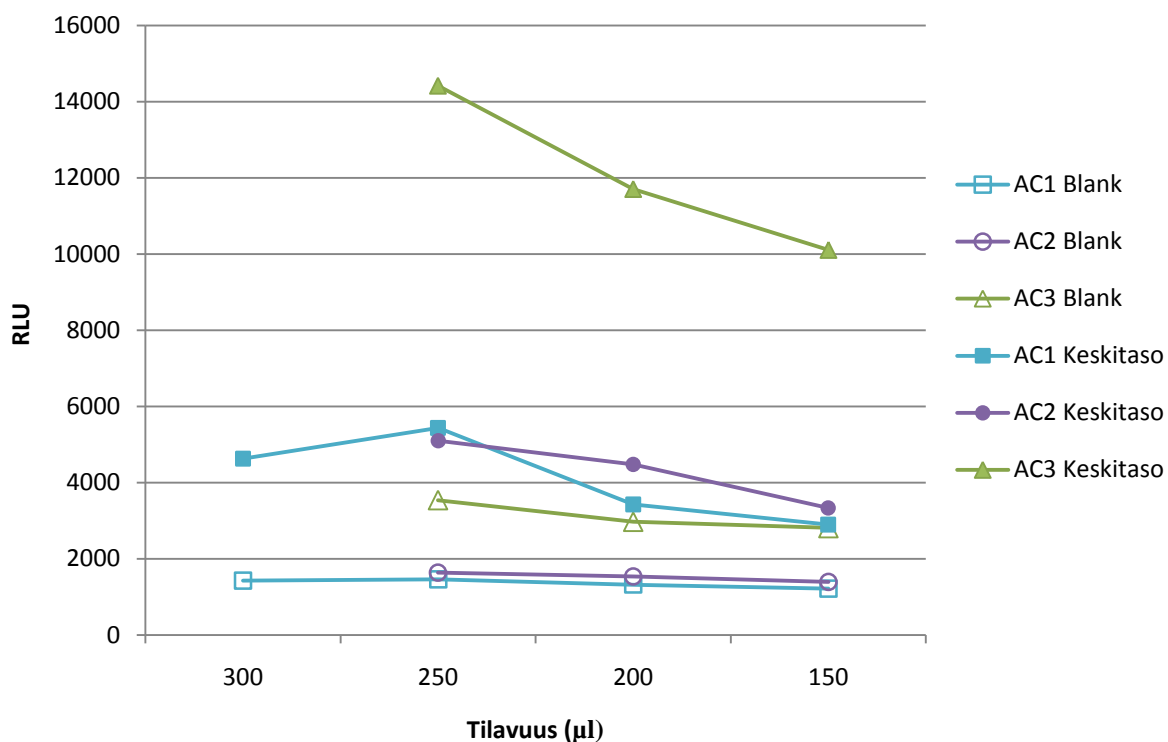
Laimennossarjojen tuloksista lasketut variaatiokertoimet olivat hyvin samankaltaisia eri laimennosten välillä ja suurimmaksi osaksi ne pysyivät alle kymmenen prosentin. Poikkeuksia olivat matalan kontrollin 1/2 -laimennos, jolle CV-% oli 21, sekä keskitason kontrollin 1/5-laimennos, jolle CV-% oli 12. Inhibitio oli matalan ja keskitason kontrolleilla vähäistä koko laimennossarjassa, mutta korkean kontrollin inhibitio kasvoi sitä mukaa, mitä vähemmän näytettä oli laimennettu. Laimentamattomalle korkealle kontrollille inhibitioprosentti oli 93,2. Tulosten perusteella päädyttiin käyttämään analyysiohjelmassa laimentamatonta näytettä, sillä se mahdollistaa menetelmälle parhaan erottelukyvyn. Laimentamatonta näytettä voidaan käyttää myös siitä syystä, että näytteen pipetointilavuus on pieni (10 µl).

#### 4.1.2 Sekundaarisen vasta-aineen optimoinnin tulokset

Sekundaarisen vasta-aineen leimauserän valinta ja sen pipetointilavuuden optimointi suoritettiin kahden laatukontrollin avulla. Blank ja keskitason kontrollit ajettiin kymmenenä rinnakkaisena määrittämisnäytteenä CLIA:lla käyttäen HTELO-II-peptidiparia (kuva 7). AC3-leimauserän avulla saatiin selkeästi voimakkain luminesenssi keskitason kontrollia käytettäessä. Kyseinen sekundaarinen

vasta-aine erottelee siis hyvin matalan ja korkean vasta-ainetason sisältävät näytteet, mikä on toivottu piirre menetelmän herkkyyden kannalta. AC3-leimauserää käytettäessä myös nollanäytteen taso oli korkein, mikä voi häiritä hyvin matalien vasta-ainemäärien havaitsemista näytteistä. Matalimmat arvot nollanäytteelle saatiin AC1-leimauserän avulla. Pipetointitilavuudella 250 µl havaittiin selkein ero kontrollinäytteiden välillä kyseistä leimauserää käytettäessä.

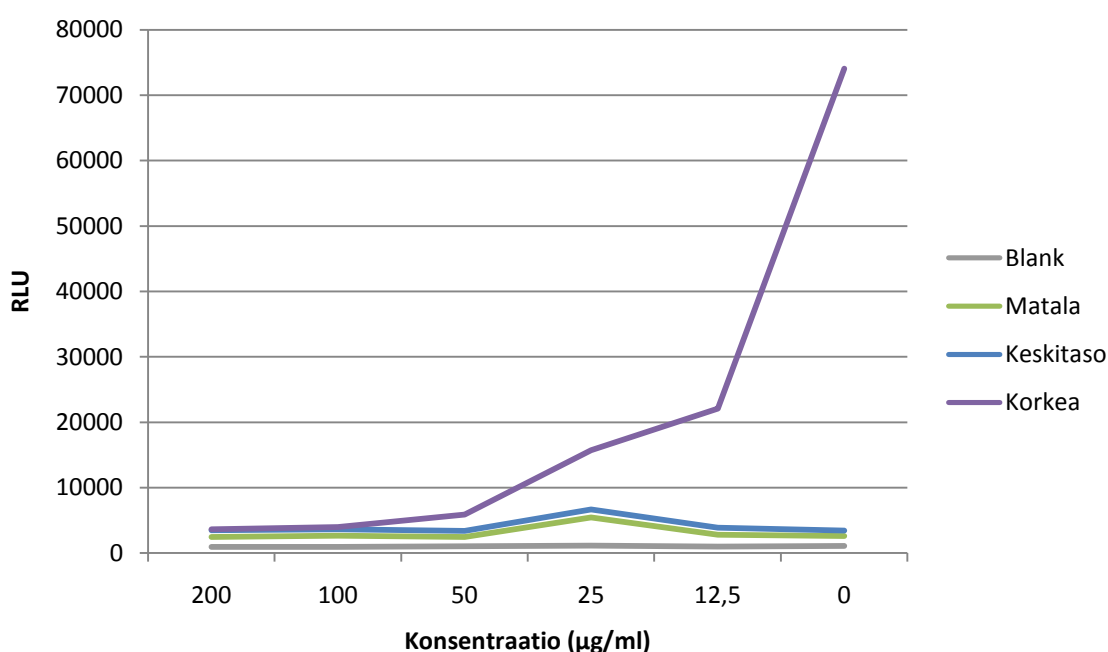
Rinnakkaismäärittämisistä lasketut variaatiokertoimet olivat hyvin samanlaisia eri leimauserien kesken. Keskihajonta puolestaan oli huomattavasti suurinta AC3-erällä ja pienintä AC1-erällä. Koska AC1 näytti toimivan muita leimauseriä paremmin matalimman taustan ja keskihajonnan perusteella, suoritettiin lisämäärittäykset blank- ja keskitason kontrolleilla käyttäen pipetointitilavuutta 300 µl. Kuviosta 7 nähdään, että sekundaarisen vasta-aineen määrän lisääminen ei kuitenkaan tuottanut entistä korkeampia RLU-arvoja. Näin ollen analyysiohjelmissa päädyttiin käyttämään AC1-leimauserän sekundaarista vasta-ainetta tilavuudella 250 µl.



KUVIO 7. HTELO-II-peptidiä käytävällä CLIA-menetelmällä saadut tulokset blank ja keskitason kontrolleille eri sekundaarisen vasta-aineen eri leimauserillä (AC1, AC2 ja AC3)

#### 4.1.3 Inhibiittoripeptidin konsentraation optimoinnin tulokset

Kuviossa 8 on esitetty inhibiitio-CLIA:lla saadut tulokset liukoisen inhibiittoripeptidin (HTELO-II) konsentraation testaamisesta neljän laatukontrollin avulla. Inhibiittorin pipetointilavuus oli 100 µl ja määrytykset tehtiin kahtena rinnakkaisena. Korkean kontrollin kuvaajasta nähdään, että inhibiittorin konsentraation kasvaessa RLU-arvot laskevat, koska inhibition määrä kasvaa. Matala ja keskitason kontrolli käyttäytyvät odottamattomasti, sillä niillä korkein RLU-arvo on mitattu inhibiittorin konsentraatiolla 25 µl. Blank-kontrollin tulokset pysyvät hyvin samanlaisina inhibiittorin määrästä riippumatta.



KUVIO 8. Inhibiitio-CLIA:lla mitatut tulokset neljästä laatukontrollista inhibiittoripeptidin (HTELO-II) eri konsentraatioilla

Inhibiittorin konsentraatiolla 0 µg/ml tehdyt määrytykset vastaavat nolla-inhibitiota, joten niiden avulla laskettiin kullekin laatukontrollille inhibition määrä eri konsentraatioita käytettäessä. Taulukkoon 3 on koottu kyseiset inhibitioprosentit. Koska matala ja keskitason kontrolli antoivat jostain syystä suurimman RLU-arvon inhibiittorin konsentraatiolla 25 µg/ml, myös niille lasketut inhibitioprosentit ovat epä johdonmukaisia. Optimaalisen konsentraation valinnassa käytettiin siten hyväksi vain korkean kontrollin inhibitioprosentteja. Määrytyksille lasketut variaatiokertoimet olivat kauttaaltaan matalia (1,1–13,7 %). Analyysiohjelmassa päätettiin käyttää inhibiittorin konsentraatiota 200 µg/ml, sillä sen avulla saatiin aikaan suurin inhibiitio.



TAULUKKO 3. Inhibition määrä prosentteina inhibiittoripeptidin (HTELO-II) eri konsentraatioilla

Konsentraatio (µg/ml)	Inhibitio (%)			
	Blank	Matala	Keskitaso	Korkea
200	11,1	5,8	-0,7	95,1
100	10	-2,5	-5,9	94,7
50	1,4	5,3	1,6	92
25	-5,9	-109	-93,5	78,8
12,5	8,3	-7,9	-12,8	70,2

#### 4.1.4 Lopullinen inhibitio-CLIA-analyysiohjelma

Edellä kuvattujen optimointivaiheiden kautta saatiin lopullinen analyysiohjelma homositrulliinivasta-aineita mittaavalle inhibitio-CLIA-menetelmälle. Taulukossa 4 on lueteltu analysaattorin suorittamat toiminnot vaihe vaiheelta inhibitio-CLIA-menetelmälle. Vastaava nolla-inhibitio-ohjelma on sille täysin identtinen lukuun ottamatta vaihetta 1, jossa pipetoidaan inhibiittoripeptidin sijaan 100 µl puskuria.

Ohjelman pystytyksessä käytettiin ainoastaan HTELO-II-peptidiparia, joten valmiin analyysiohjelman toiminta tarkistettiin myös HTELO-I-peptideillä. Laatuksentrollit määritettiin kahtena rinnakkaisena inhibitio- ja nolla-inhibitio-ohjelmilla. Määritysten tulokset on esitetty taulukossa 5 ja niistä nähdään, että menetelmä toimii molemmilla peptidipareilla yhtä hyvin.

TAULUKKO 4. HTELO-I ja -II -antigeeneihin sitoutuvien autovasta-aineiden määrittämiseen pystytetyn automatisoidun inhibitio-CLIA:n vaiheet

Vaihe	Analysaattorin suorittamat toiminnot
1.	Pipetointi: 100 µl liukoista inhibiittoripeptidiä (200 µg/ml)
2.	Pipetointi: 10 µl näytettä + 1800 sekunnin inkubaatio + sekoitus
3.	Pipetointi: 15 µl magneettipartikkeleita (4 µg/ml) + 630 sekunnin inkubaatio + sekoitus
4.	Pesu
5.	Pipetointi: 250 µl leimattua sekundaarista vasta-ainetta (50 µl/100 ml, erä AC1) + 630 sekunnin inkubaatio + sekoitus
6.	Pesu
7.	Luminesenssin mittaus (RLU)

*Taulukko 5. Kahtena rinnakkaisena määritettyjen laatukontrollien tulokset homositrulliinivasta-aineita mittaavilla inhibitio-CLIA-ohjelmilla*

Kontrolli	Menetelmä	HTELO-I			HTELO-II		
		ka. (RLU)	CV-%	inhibitio-%	ka. (RLU)	CV-%	inhibitio-%
Blank	Inhibitio	954	8,9		996	14,9	
	Nolla-inhibitio	937	4,2	-1,9	932	14,0	-6,9
Matala	Inhibitio	2014	12,4		1581	1,0	
	Nolla-inhibitio	1756	2,3	-14,7	1633	2,9	3,2
Keskitaso	Inhibitio	3736	10,2		2569	20,5	
	Nolla-inhibitio	4276	10,4	12,6	2521	6,3	-1,9
Korkea	Inhibitio	6455	8,3		4041	9,9	
	Nolla-inhibitio	78770	0,9	91,8	61891	4,4	93,5

## 4.2 Homositrulliinivasta-aineita mittaavan inhibitio-CLIA:n validoinnin tulokset

Optimoinnin jälkeen määritettiin HTELO-I ja -II -peptideihin sitoutuvat vasta-aineet laatukontrollista sekä potilas- ja kontrolliaineistoista. Laatukontrollien avulla määritettiin menetelmien toistotarkkuudet. Menetelmien sensitiivisyys ja spesifisyys analysoitiin potilas- ja kontrolliaineistojen avulla. Kyseisistä aineistoista saatuja tuloksia verrattiin lisäksi jo aiemmin määritettyihin inhibitio-ELISA-tuloksiin.

### 4.2.1 Inhibitio-CLIA:n toistotarkkuus

Potilas- ja kontrolliaineistot analysoitiin neljän päivän aikana ja jokaisena päivänä ajettiin ensin laatukontrollit (blank, matala, keskitaso ja korkea) kolmena rinnakkaisena määrittämisinä. Määrittäykset tehtiin molemmilla peptidipareilla (HTELO-I ja -II) sekä inhibitio- että nolla-inhibitio-ohjelmilla. Tuloksena saaduista RLU-arvoista laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin. Taulukkoon 6 on poimittu neljältä analyysipäivältä minimi- ja maksimiarvot edellä mainituille tunnusluvuille, joten sen avulla voidaan arvioida analyysisarjojen sisäistä variaatiota (intra-assay variation). Tulokset vaikuttavat hyvin lupaavilta, sillä suurin osa variaatiokertoimista jää alle kymmenen prosentin, mitä pidetään kliinisessä kemiassa yleisesti varsin hyvänä tuloksena. Peptidiparien välillä ei havaittu merkittäviä eroja tuloksissa.

TAULUKKO 6. Homositrulliinivasta-aineita mittaavalla CLIA:lla määritettyjen laatukontrollien analyysisarjojen sisäinen variaatio (kaikissa ryhmissä  $n = 3$ )

Peptidit	Kontrolli	Menetelmä	ka. (RLU) min-max	SD min-max	CV-% min-max
HTELO-I	Blank	Inhibitio	1573–1996	26–117	1,3–7,5
		Nolla-inhibitio	1479–1901	77–142	4,2–9,6
	Matala	Inhibitio	2713–3793	85–183	2,7–5,1
		Nolla-inhibitio	2747–3679	45–198	1,4–5,5
	Keskitaso	Inhibitio	5014–8247	274–573	5,5–6,9
		Nolla-inhibitio	6043–9293	197–1101	2,6–13,2
	Korkea	Inhibitio	6062–9295	697–1236	10,2–14,3
		Nolla-inhibitio	81386–130954	5628–8976	4,4–10,0
HTELO-II	Blank	Inhibitio	1359–1751	18–162	1,0–10,1
		Nolla-inhibitio	1297–1490	11–233	0,8–17,9
	Matala	Inhibitio	2353–2774	37–185	1,6–6,1
		Nolla-inhibitio	2637–3065	22–240	0,7–7,8
	Keskitaso	Inhibitio	3719–4174	59–273	1,4–7,3
		Nolla-inhibitio	3643–4557	325–408	7,4–9,2
	Korkea	Inhibitio	4382–4923	62–399	1,4–8,1
		Nolla-inhibitio	94546–112575	1220–11908	1,2–12,4

Laatukontrollimääritysten välinen variaatio on esitetty taulukossa 7. Siihen on koottu kaikkien neljän päivän analyysisarjojen RLU-tuloksista lasketut keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet. Hajontaluvut ovat tässä tapauksessa hieman suurempia kuin taulukossa 6, mutta analyysipäivien välinen variaatio on yleisestikin suurempaa kuin niiden sisäinen variaatio. HTELO-II-peptidejä käytettäessä analyysimenetelmän toistotarkkuus näyttää olevan parempi kuin HTELO-I-peptideillä. Kummallakin peptidiparilla menetelmän toistotarkkuuden voidaan kuitenkin todeta olevan hyvä.

TAULUKKO 7. Homositrullinivasta-aineita mittaavalla CLIA:lla määritettyjen laatukontrollien analyysisarjojen välinen variaatio (kaikissa ryhmissä  $n = 12$ )

Kontrolli	Menetelmä	HTELO-I			HTELO-II		
		ka. (RLU)	SD	CV-%	ka. (RLU)	SD	CV-%
Blank	Inhibitio	1841	190	10,3	1585	179	11,3
	Nolla-inhibitio	1720	198	11,5	1375	135	9,8
Matala	Inhibitio	3316	457	13,8	2637	205	7,8
	Nolla-inhibitio	3293	400	12,1	2864	204	7,1
Keskitaso	Inhibitio	6798	1441	21,2	4024	249	6,2
	Nolla-inhibitio	7739	1366	17,7	4192	471	11,2
Korkea	Inhibitio	7763	1555	20,0	4614	307	6,7
	Nolla-inhibitio	111852	21856	19,5	100591	10323	10,3

#### 4.2.2 Inhibitio-ELISA:n ja inhibitio-CLIA:n välinen korrelaatio

Inhibitio-ELISA:n ja inhibitio-CLIA:n välisen riippuvuuden tilastollinen tutkiminen kertoo siitä, mitaavatko kyseiset menetelmät samaa asiaa. Molemmilla menetelmillä määritetyt tulokset potilas- ja kontrolliaineistoista ( $n = 132$ ) analysoitiin Passing-Bablok-regressioanalyysillä ja niille laskettiin Pearsonin korrelaatiokerroin. Taulukkoon 8 on koottu edellä mainittujen tilastollisten testien tulokset. HTELO-I-peptidiparia käytettäessä inhibitio-ELISA:n ja inhibitio-CLIA:n välille laskettu Pearsonin korrelaatiokertoimen arvo on 0,61 ja HTELO-II-peptidien tapauksessa se on 0,64. Menetelmät näyttävät siis korreloivan kummassakin tapauksessa melko hyvin. Passing-Bablok-regressionanalyysin tiukat kriteerien mukaan menetelmien välillä ei ole riippuvuutta, koska kummankaan peptidiparin kohdalla menetelmien regressiokäyrän kulmakertoimen 95 prosentin luottamusväli ei sisältänyt arvoa yksi, eikä leikkauspisteen luottamusväli sisältänyt arvoa nolla.

TAULUKKO 8. Homositrulliinivasta-aineita mittaavien inhibitio-ELISA:n ja inhibitio-CLIA:n välinen korrelaatio

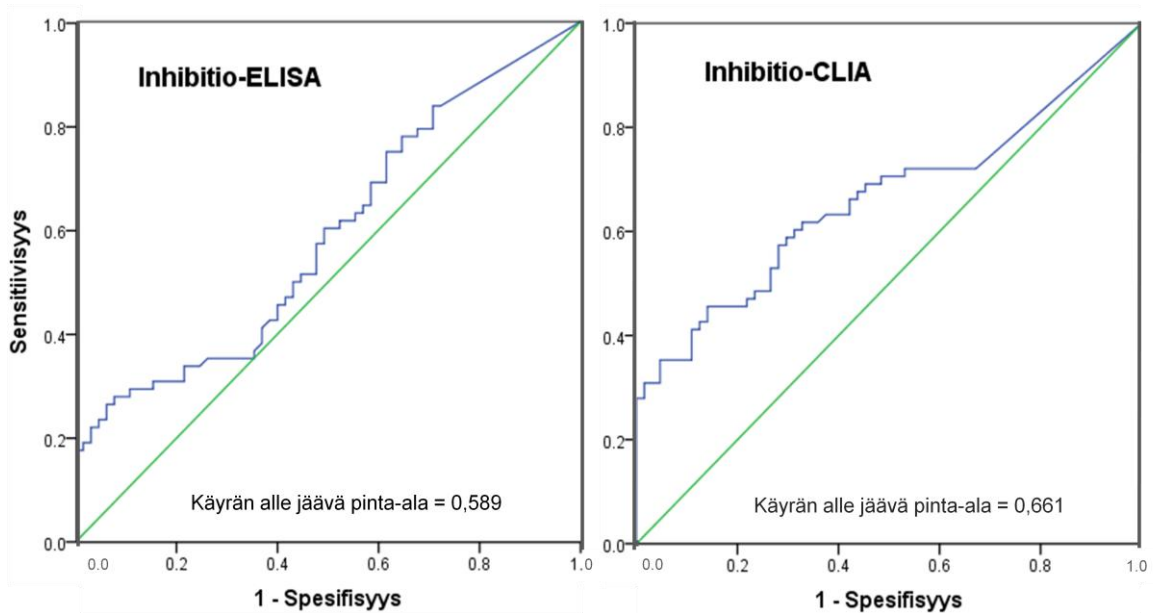
Peptidit	n	Pearsonin	Passing-Bablok-regressio			
		korrelaatio	Kulmakerroin	95 % CI	Leikkauspiste	95 % CI
HTELO-I	132	0,61	1,68	1,28–2,17	-5,91	-9,02–(-2,26)
HTELO-II	132	0,64	2,17	1,69–2,67	-2,34	-5,92–(-0,61)

#### 4.2.3 Inhibitio-CLIA:n sensitiivisyys ja spesifisyys sekä vertailu inhibitio-ELISA:an

Nivelreuman suhteen terveiden kontrollien (n = 65) avulla määritettiin homositrulliinivasta-aineita mittaavalle inhibitio-CLIA:lle viiterajat positiivisten ja negatiivisten näytteiden luokittelua varten. Tarkastelussa käytettiin inhibitioprosentteja ja ensin molemmista aineistoista poistettiin keskiarvosta yli kolmen keskihajonnan verran poikkeavat tulokset (n = 1). HTELO-I-peptideillä saatiin inhibitioprosentin keskiarvoksi 6,27, keskihajonnaksi 7,45 ja viiterajaksi 21,17. Viiterajan mukaan potilaskontrolleista kolme luokiteltiin tämän testin suhteen positiivisiksi. HTELO-II-peptideillä inhibitioprosentin keskiarvo oli 7,25, keskihajonta 7,99 ja viiteraja 23,24. Kyseisen testin suhteen positiivisia näytteitä löytyi potilaskontrolleista neljä.

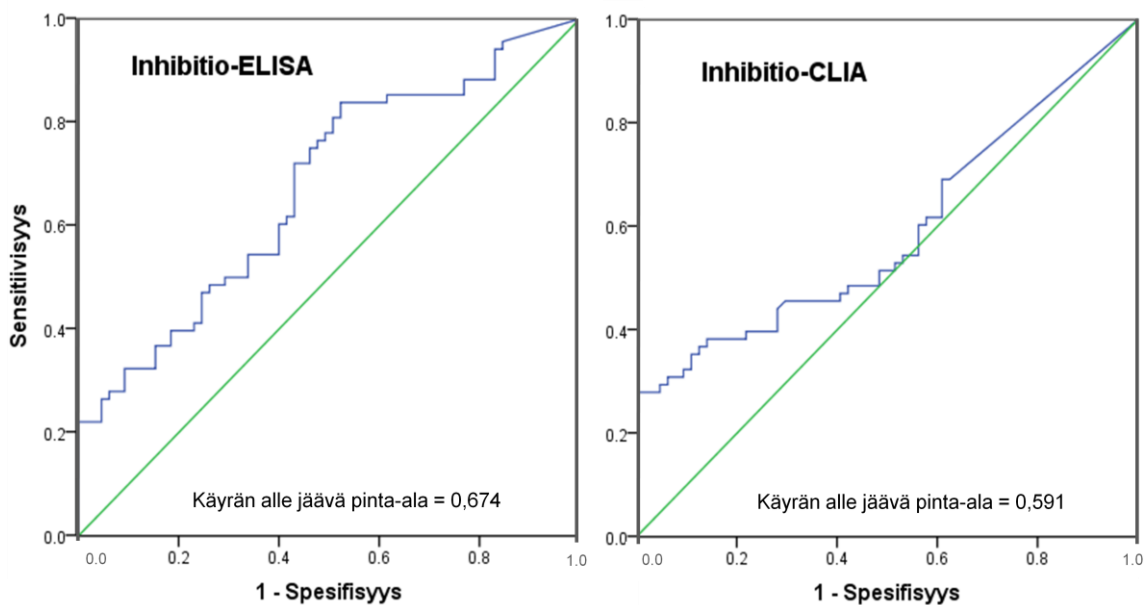
RA-potilasaineistossa HTELO-I-peptidiparilla 23 näytettä antoi inhibitioprosenttien mukaan positiivisen tuloksen (n = 68, ka. = 23,96 ja SD = 28,86). HTELO-II-peptideillä samasta aineistosta saatiin 20 positiivista tulosta (n = 68, ka. = 18,72 ja SD = 25,41). Kummallakin menetelmällä havaittiin RA-potilaiden seeruminäytteissä huomattavasti enemmän positiivisia tapauksia kuin potilaskontrolleissa.

Kuviossa 9 on esitetty ROC-kuvaajat inhibitio-ELISA:lle ja inhibitio-CLIA:lle, kun analyyseissä käytettiin HTELO-I-peptidiparia. Inhibitio-ELISA:lla käyrän alle jäävä pinta-ala on 0,589 ja inhibitio-CLIA:lla 0,661, joten viimeksi mainittu menetelmä luokittelee aineiston jonkin verran todenmukaisemmin terveisiin ja sairaisiin. Inhibitio-CLIA:lla myös käyrän muoto on lähempänä optimaalista, joten se on jonkin verran sensitiivisempi ja spesifisempi menetelmä kuin inhibitio-ELISA.



KUVIO 9. ROC-kuvaajat HTELO-I-peptidiparilla suoritetuille inhibitio-ELISA:lle ja inhibitio-CLIA:lle (inhibitio-ELISA:  $n = 133$ , inhibitio-CLIA:  $n = 132$ )

Kuviossa 10 on esitetty ROC-kuvaajat HTELO-II-peptidiparin inhibitio-ELISA:lle ja inhibitio-CLIA:lle. Käyrän alle jäävä pinta-ala on inhibitio-ELISA:lla 0,674 ja inhibitio-CLIA:lla 0,591. Tulokset ovat päinvastaiset kuin HTELO-I-peptidiparin kohdalla (kuvio 9), sillä tässä tapauksessa inhibitio-ELISA luokittelee aineiston luotettavammin positiivisiin ja negatiivisiin.



KUVIO 10. ROC-kuvaajat HTELO-II-peptidiparilla suoritetuille inhibitio-ELISA:lle ja inhibitio-CLIA:lle (inhibitio-ELISA:  $n = 133$ , inhibitio-CLIA:  $n = 132$ )

#### 4.2.4 Inhibitio-ELISA:n ja inhibitio-CLIA:n välinen ristiintaulukointi

Kuviossa 11 on esitetty HTELO-I-peptidiparia hyödyntävien inhibitio-ELISA:n ja inhibitio-CLIA:n välinen ristiintaulukointi. Aineistona oli 68 RA-potilaan seeruminäytteet. Kuviosta nähdään, että menetelmät luokittelevat potilaat kliinisesti hyvin samalla tavalla positiivisiin ja negatiivisiin sen suhteen, havaitaanko heillä HTELO-I-antigeeneihin sitoutuvia autovasta-aineita. Referenssimenetelmään eli inhibitio-ELISA:an verrattuna inhibitio-CLIA antaa kuitenkin kahdessa tapauksessa väärän negatiivisen tuloksen ja yhdeksässä tapauksessa väärän positiivisen tuloksen. Ristiintaulukoinnin merkitsevyyttä testattiin tilastollisesti khiin neliötestillä ( $\chi^2 = 26,932$ ,  $p < 0,001$ ) sekä kontingenssikertoimella. Khiin neliötestin tulos on erittäin merkitsevä, eli menetelmien välillä havaitaan riippuvuus. Kontingenssikertoimen ( $C = 0,533$ ) perusteella riippuvuus on kohtalaisen vahva, toisin sanoen menetelmien voidaan katsoa mittaavan samaa asiaa.

		HTELO-I inhibitio-CLIA		
		+	-	
HTELO-I inhibitio-ELISA	-	9	43	
	+	14	2	

$p < 0,001$   
 $C = 0,533$

KUVIO 11. HTELO-I-peptidiparia käyttävien inhibitio-ELISA:n ja inhibitio-CLIA:n välinen ristiintaulukointi ( $n = 68$ )

HTELO-II-peptidiparilla suoritettujen inhibitio-ELISA:n ja inhibitio-CLIA:n välinen ristiintaulukointi on esitetty kuviossa 12. Sen mukaan menetelmät luokittelevat RA-potilaat ( $n = 68$ ) melko samalla tavalla positiivisiin ja negatiivisiin sen suhteen, onko heillä HTELO-II-peptideihin sitoutuvia autovasta-aineita. Inhibitio-CLIA on kuitenkin antanut neljässä tapauksessa väärän negatiivisen ja kymmenessä tapauksessa väärän positiivisen tuloksen verrattuna inhibitio-ELISA:an, joka oli valittu referenssimenetelmäksi. Khiin neliötestin mukaan menetelmät mittaavat samaa asiaa erittäin merkitsevästi ( $\chi^2 = 14,991$ ,  $p < 0,001$ ). Kontingenssikertoimen arvo 0,425 viittaa siihen, että menetelmät luokittelevat aineiston kohtalaisen samalla tavalla.

		HTELO-II inhibitio-CLIA		
		+	-	
HTELO-II inhibitio-ELISA	-	10	44	p < 0,001 C = 0,425
	+	10	4	

KUVIO 12. HTELO-II-peptidiparia käyttävien inhibitio-ELISA:n ja inhibitio-CLIA:n välinen ristiintaulukointi (n = 68)

RA-potilasaineisto analysoitiin inhibitio-CLIA:lla käyttäen HTELO-I ja -II -peptidipareja. Ristiintaulukoinnin avulla voidaan arvioida näiden menetelmien riippuvuutta. Kuviosta 13 nähdään, että suurin osa potilaista luokituu joko molempien menetelmien suhteen negatiiviseksi (n = 40) tai molempien suhteen positiiviseksi (n = 15). Vain HTELO-I tai HTELO-II -vasta-aineita havaittiin 13 potilaalla. Khiin neliötestin perusteella menetelmien välillä on tilastollisesti merkitsevä riippuvuus ( $\chi^2 = 21,462$ ,  $p < 0,001$ ), jonka vahvuus on kontingenssikertoimen arvon ( $C = 0,490$ ) mukaan kohtalainen.

		HTELO-II inhibitio-CLIA		
		+	-	
HTELO-I inhibitio-CLIA	-	5	40	p < 0,001 C = 0,490
	+	15	8	

KUVIO 13. HTELO-I ja -II -peptidipareilla saatujen inhibitio-CLIA-tulosten välinen ristiintaulukointi (n = 68)



## 5 POHDINTA

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli pystyttää ja validoida automaattinen analyysimenetelmä homositrulliinivasta-aineiden määrittämistä varten. Työn tarkoituksena oli tuottaa menetelmä, jonka toistotarkkuus, sensitiivisyys ja spesifisyys olisivat riittävän hyvät tutkimuskäyttöä varten. IDS-iSYS-analysaattorille pystytettiin homositrulliinivasta-aineita mittaava inhibitiio-CLIA sitrulliinivasta-aineiden määrittämisessä käytetyn analyysiohjelman pohjalta. Antigeenina käytettyjen homositrullinisoitujen peptidien tiedettiin toimivan määrittämisessä hyvin, koska niitä oli testattu manuaalisella inhibitiio-ELISA:lla. Edellä mainittua menetelmää käytettiin referenssimenetelmänä validointituloksia analysoitaessa.

Menetelmän pystytys sujui lähes suunnitellusti, vaikka muutamia suunnitelmasta poikkeavia lisätestauksia täytyikin tehdä. Jo lähtökohtana ollut analyysiohjelma toimi suhteellisen hyvin myös homositrullinisoituilla peptideilla. Lopulliseen ohjelmaan muutettiin alkuperäiseen nähden inhibitiitoripeptidin konsentraatio kaksinkertaiseksi ja sekundaarisesta vasta-aineesta otettiin käyttöön AC3-leimauserän sijasta AC1. Korkean homositrulliinivasta-ainepitoisuuden sisältävälle laatu-kontrollille saatiin lopullisella ohjelmalla suuri inhibitioprosentti molemmilla peptidipareilla ja hajontaluvut pysyivät suhteellisen matalina. Alhaisen taustalumesenssin vuoksi menetelmällä on mahdollista mitata myös matalia vasta-ainepitoisuuksia.

Optimointivaiheessa keskitason laatukontrollista saatiin hyvin vaihtelevia tuloksia. Näyte oli Oulun yliopistollisen sairaalan kontrolliseerumia, johon on koottu ylimääräisiä seeruminäytteitä sairaalan potilasnäytteistä ja jota käytetään sairaalassa eri analysaattoreiden sisäisenä kontrollina. Yleensä kontrolliseerumissa on mukana myös sen verran nivelreumapotilaita, että erilaiset autovasta-ainepitoisuudet ovat keskitasoa. Tällä kertaa reumapotilaiden näytteitä oli ilmeisesti mukana vähemmän, sillä keskitason laatukontrolli oli homositrulliinivasta-ainepitoisuudeltaan hyvin lähellä matalaa laatukontrollia. Koska seerumi oli kokoelma suuresta määrästä seeruminäytteitä, pieniin eppendorf-putkiin pipetoidut kontrollinäytteet eivät välttämättä olleet täysin homogeenisiä keskenään. Tämä voi osaltaan selittää, miksi keskitason kontrollille saadut tulokset heittelivät analyysipäivien välillä enemmän kuin muiden laatukontrollien tulokset. Menetelmän optimoinnin ja validoinnin kannalta olisi ollut järkevää käyttää keskitason kontrollina esimerkiksi laimennettua korkeaa laatukontrollia eli reumapotilaan seeruminäytettä. Korkeaa kontrollia oli kuitenkin niin vähän, että sitä ei voitu käyttää keskitason kontrollin tekoon.

Validointivaiheessa analysoitujen laatukontrollien perusteella menetelmän toistotarkkuus oli hyvä sekä HTELO-I että HTELO-II-peptideihin sitoutuvia vasta-aineita määritettäessä. Tyypin I -peptideitä käytettäessä analyysisarjojen välinen vaihtelu oli jonkin verran suurempaa kuin tyypin II -peptidiparilla. Potilas- ja kontrolliaineistoista saatuja tuloksia vertailtiin inhibitio-ELISA:lla saatuihin tuloksiin ja Pearsonin korrelaatiokertoimen perusteella ne korreloivat suhteellisen hyvin keskenään. Passing-Bablok-regressioanalyysin tiukkojen kriteerien mukaan menetelmien välillä ei ollut riippuvuutta, eli inhibitio-CLIA ei antanut yhteneviä tuloksia inhibitio-ELISA:n kanssa.

Kummankin tyypin peptidipareilla tehdyissä määrittelyissä RA-potilasaineistossa oli huomattavasti enemmän positiivisia testituloksia kuin kontrolliaineistossa. Näin ollen nivelreumapotilailla on selvästi useammin seerumissaan homositrullinisoituihin antigeeneihin sitoutuvia autovasta-aineita kuin terveillä henkilöillä. ROC-analyysillä ja ristiintaulukoinnilla tutkittiin inhibitio-CLIA:n kliinistä käyttökelpoisuutta verrattuna inhibitio-ELISA:an. ROC-analyysi antoi kuvan menetelmien sensitiivisyydestä ja spesifisyydestä, kun tarkasteltiin sekä potilas- että kontrolliaineistoja. Ristiintaulukoinnilla vertailtiin, kuinka samankaltaisesti menetelmät luokittelevat nivelreumapotilaiden näytteet positiivisiin ja negatiivisiin. HTELO-I-peptidiparia käytettäessä inhibitio-CLIA oli hieman sensitiivisempi ja spesifisempi menetelmä kuin inhibitio-ELISA. Ristiintaulukoinnin tulokset olivat samansuuntaisia, sillä inhibitio-CLIA:lla saatiin enemmän positiivisia tuloksia kuin inhibitio-ELISA:lla, mutta menetelmien välillä oli kuitenkin kohtalainen riippuvuus. HTELO-II-peptidiparin tapauksessa inhibitio-ELISA oli ROC-analyysin perusteella sensitiivisempi kuin inhibitio-CLIA. Ristiintaulukoinnin mukaan inhibitio-CLIA antoi kuitenkin enemmän positiivisia tuloksia potilasaineistosta, joten tulokset ovat hieman ristiriitaisia.

Nivelreumapotilas- ja kontrolliaineistoissa oli alun perin 80 potilasnäytettä, mutta osa niistä jouduttiin jättämään pois vähäisen näytemäärän takia. Validointiaineistoksi lopullinen näytemäärä (68 potilasnäytettä ja 65 kontrollinäytettä) on melko niukka, mutta kuitenkin riittävä tilastollisia analyyseja ajatellen. Määritysten luotettavuutta olisi lisännyt näytteiden ajo kahtena rinnakkaisena määrittämisinä. Tällöin olisi havaittu mahdolliset poikkeavat tulokset rinnakkaisajojen erojen avulla ja ne olisi voitu jättää pois tulosten analysoinnissa. Yhdestä näytteestä täytyi kuitenkin määrittää sekä HTELO-I että HTELO-II-peptideihin sitoutuvat vasta-aineet ja kummallekin peptidiparille oli tehtävä määrittelyt inhibitio- ja nolla-inhibitio-ohjelmilla. Jos näytteet olisi ajettu kahtena rinnakkaisena, olisi niistä osa täytynyt jättää pois niukan näytemäärän takia. Lisäksi rinnakkaiset ajot olisivat lisänneet huomattavasti määrittelyyn tarvittavaa aikaa ja nostaneet kustannuksia.

Työn aihe oli erittäin mielenkiintoinen, sillä se liittyy hyvin ajankohtaiseen tutkimukseen. Nivelreuman etiologiaan liittyviä tutkimuksia on julkaistu runsaasti viime aikoina ja monet niistä liittyvät erilaisten proteiinien karbamylaatioon (ks. esim. Mydel ym. 2010; Scinocca ym. 2011; Shi ym. 2011). Pystytetty homositrulliinivasta-aineita mittaava inhibitiio-CLIA on epäilemättä hyvä työkalu tulevaa tutkimustyötä varten. Sitä voi edelleen muokata ja tarvittaessa suorittaa vielä kattavamman validoinnin, mutta tämän opinnäytetyön tavoitteet saatiin täytettyä. Tutkimuksen tekeminen opetti paljon uutta muun muassa tutkimuksen suunnittelusta, immunologisista menetelmistä ja laboratoriomenetelmän validointiprosessista.

## LÄHTEET

Bilić-Zulle, L. 2011. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochemica Medica* 21 (1), 49–52.

van Boekel, M. A. M., Vossenaar, E. R., van den Hoogen F. H. J. & van Venrooij, W. J. 2002. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Research* 4 (2), 87–93.

Davies, C. 2005. Introduction to immunoassay principles. Teoksessa: Wild, D. (toim.) *The Immunoassay Handbook*. 3. painos. Oxford: Elsevier, 3–40.

Ehder, T. (toim.) 2005. *Kemian metrologian opas*. Helsinki: Mittatekniikan keskus MIKES.

Fawcett, T. 2006. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters* 27, 861–874.

Haapala, A.-M. 2010. Allergian ja autoimmuunisairauksien laboratoriodiagnostiikka. Teoksessa: O. Niemelä & K. Pulkki (toim.) *Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia*. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus, 162–165.

Heikkilä, R. 2008. Biologisten menetelmien validointi. Luentomateriaali: FINAS-päivä 24.1.2008. Hakupäivä 19.12.2011 [http://www.mikes.fi/documents/upload/finas-paiva2008\\_heikkila.pdf](http://www.mikes.fi/documents/upload/finas-paiva2008_heikkila.pdf).

Heikkilä, T. 2008. *Tilastollinen tutkimus*. Helsinki: Edita.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2000. *Tutki ja kirjoita*. Helsinki: Tammi.

Häyrynen, J. 2010. Implementation of automated immunoanalyzer. Oulun seudun ammattikorkeakoulu. Laboratorioalan koulutusohjelma. Opinnäytetyö.

Immunodiagnostic Systems France 2010. *IDS-iSYS User Manual*, Software version 8.XX. Pouilly-en-Auxois: IDS France.

Kairisto, V. 2010. Laboratoriotulosten tulkinta. Teoksessa: O. Niemelä & K. Pulkki (toim.) Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus, 35–48.

Klareskog, L. Padyukov, L. & Alfredsson, L. 2007. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. *Current Opinion in Rheumatology* 19, 49–54.

Koivula, M.-K. 2006. Autoantibodies binding citrullinated type I and II collagens in rheumatoid arthritis. Oulun yliopisto. Kliinisen kemian laitos. Väitöskirja.

Koivula, M.-K., Heliövaara, M., Ramberg, J., Knekt, P., Rissanen, H., Palosuo, T. & Risteli, J. 2007. Autoantibodies binding to citrullinated telopeptide of type II collagen and to cyclic citrullinated peptides predict synergistically the development of seropositive rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 66, 1450–1455.

Koivula, M.-K., Häyrynen, J. & Risteli, J. Validation of automated inhibition chemiluminescent immunoassay for autoantibodies to citrullinated telopeptide of type II collagen in rheumatoid arthritis. Julkaisematon käsikirjoitus.

Koivula, M.-K., Ramberg, J., Åman, S., Karjalainen, A., Hakala, M. & Risteli, J. 2005. Sensitive immunoassays for the autoantibodies reacting against citrullinated carboxy-terminal telopeptides of type I and type II collagens in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 43 (12), 1400–1405.

Koivula, M.-K., Åman, S., Karjalainen, A., Hakala, M. & Risteli, J. 2005. Are there autoantibodies reacting against citrullinated peptides derived from type I and type II collagens in patients with rheumatoid arthritis? *Annals of the Rheumatic Diseases* 64, 1443–1450.

Kricka, L. & Wild, D. 2005. Signal generation and detection systems (Excluding homogenous assays). Teoksessa: Wild, D. (toim.) *The Immunoassay Handbook*. 3. painos. Oxford: Elsevier, 192–211.

Käypä hoito -suositus 2009. Nivelreuma. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Reumatologisen yhdistyksen asettama työryhmä. Päivitetty 18.9.2009.

Mustajoki, P. 2010. Nivelreuma. Lääkärikirja Duodecim, Hakupäivä 6.6.2011. [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00051](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00051).

Mydel, P., Wang, Z., Brisslert, M., Hellvard, A., Dahlberg, L. E., Hazen, S. L. & Bokarewa, M. 2010. Carbamylation-dependent activation of T Cells: a novel mechanism in the pathogenesis of autoimmune arthritis. *The Journal of Immunology* 184 (12), 6882–6890.

Risteli, J., Koivula, M.-K. & Risteli, L. 2007. Citrullinated collagens in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Expert Review of Clinical Immunology* 3, 187–194.

Risteli, J. & Risteli, L. 2010. Luusto ja muu sidekudos. Teoksessa: O. Niemelä & K. Pulkki (toim.) *Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia*. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus, 179–187.

Savolainen, K. & Parviainen, M. 2010. Immunokemialliset menetelmät. Teoksessa: O. Niemelä & K. Pulkki (toim.) *Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia*. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus, 65–67.

Scinocca, M., Bell, D. A., Pope, J., Cairns, E. & Barra, L. J. 2011. Rheumatoid arthritis patients have anti-homocitrullinated fibrinogen antibodies. (abstract). *Arthritis & Rheumatism*, 63 (10), 2185.

Shi, J., Knevel, R., Suwannalai, P., van der Linden, M. P., Janssen, G. M., van Veelen, P. A., Levarht, N. E., van der Helm-van Mil, A. H., Cerami, A., Huizinga, T. W., Toes, R. E. & Trouw, L. A. 2011. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (42), 17372–17377.

Turunen, S., Koivula, M.-K., Risteli, L. & Risteli, J. 2010. Anticitrulline antibodies can be caused by homocitrulline-containing proteins in rabbits. *Arthritis & Rheumatism* 62 (11), 3345–3352.

Uhari, M. & Nieminen, P. 2001. *Epidemiologia ja biostatistiikka*. Helsinki: Duodecim.

van Venrooij, W. J., van Beers, J. J. & Pruijn, G. J. 2011. Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future. *Nature Reviews Rheumatology* 7(7), 391–398.

Wang, Z., Nicholls, S. J., Rodriguez, E. R., Kumm, O., Hökkö, S., Barnard, J., Reynolds, W. F., Topol, E. J., Didonato, J. A. & Hazen, S. L. 2007. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nature Medicine* 13 (10), 1176–1184.

Wild, D. & Kusnezow, W. 2005. Separation systems. Teoksessa: Wild, D. (toim.) *The Immunoassay Handbook*. 3. painos. Oxford: Elsevier, 177–191.

## LIITE 1. Työssä käytetyt puskurit

### AC-puskuri

14,7 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O (Merck)
2,4 g/l	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O (Merck)
9,0 g/l	NaCl (Merck)
4,0 g/l	BSA (Sigma A7888)
0,5 g/l	NaN <sub>3</sub>
0,5 ml/l	Proclin 300 (Supelco)
0,5 ml/l	Tween 20 (Fluka 93773)

Lopuksi säädetään pH 5,9:ään.

### Assay-puskuri

1,21 g/l	Tris(hydroksimetyyliamino- metaani) (Bio-Rad)
20,46 g/l	NaCl
10,0 g/l	BSA
10,0 ml/l	TritonX-100 (Sigma T-8787)
1,0 g/l	SDS (Fluka 71730)
5,0 g/l	Natriumdeoksikolaatti (Sigma D-6750)
10,0 ml/l	Kanin 0-seerumi

Säädetään pH 7,6:een ennen kanin  
0-seerumin lisäystä, jonka jälkeen pullo täy-  
tetään merkkiin. Suodatus 0,2 µm filterillä.

### EIA-yleispuiskuri

2,42 g/l	Tris(hydroksimetyyliamino- metaani)
8,77 g/l	NaCl
1,0 g/l	BSA
0,5 ml/l	Tween 20

Säädetään pH 7,5:een. Suodatus Bühnerillä.

### PBSB-puskuri

8,0 g/l	NaCl
0,2 g/l	KCl (Merck)
1,15 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
0,2 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)
5,0 g/l	BSA

Säädetään pH 7,2:een. Suodatus 0,2 µm  
filterillä.



## LIITE 2. Käytetyt lyhenteet

BSA	Naudan seerumin albumiini (bovine serum albumin)
CLIA	Kemiluminesenssiin perustuva immunomääritysmenetelmä (chemiluminescence immunoassay)
CV	Variaatiokerroin, ilmoitetaan yleensä prosentteina (coefficient of variation)
EIA	Entsyymi-immunologinen menetelmä (enzyme immunoassay)
ELISA	Entsyymi-immunologinen menetelmä (enzyme-linked immunosorbent assay)
HTELO-I	Homositrullinisoitu tyypin I kollageenin karboksyyliterminaalinen peptidi
HTELO-II	Homositrullinisoitu tyypin II kollageenin karboksyyliterminaalinen peptidi
IgG	Immunoglobuliini G -luokan vasta-aine
PAD	Peptidyyliargininideiminaasi-entsyymi
PBSB	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos, jossa naudan seerumin albumiinia (phosphate buffer saline, BSA)
RA	Nivelreuma (rheumatoid arthritis)
RLU	Mitatun luminesenssin intensiteettiä kuvaava yksikkö IDS-iSYS-analysaattorilla (relative light unit)
ROC	Tilastollinen menetelmä laboratoriomenetelmän sensitiivisyyden ja spesifisyyden analysointiin (receiver operating characteristic)
SD	Keskihajonta (standard deviation)
SDS	Natriumlauryylisulfaatti (sodium dodecyl sulfate)
TMB	3, 3', 5, 5' -tetrametyylibentsidiini